



CINTIA DO COUTO MASCARENHAS

IDENTIFICAÇÃO E INVESTIGAÇÃO DE GENES
DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ENTRE PACIENTES
COM LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA E INDIVÍDUOS
CONTROLE

CAMPINAS

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

CINTIA DO COUTO MASCARENHAS

**IDENTIFICAÇÃO E INVESTIGAÇÃO DE GENES
DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ENTRE PACIENTES
COM LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA E INDIVÍDUOS
CONTROLE.**

Orientador (a): Prof. Dr. Carmino Antonio de Souza

Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Doutora em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA CINTIA DO COUTO
MASCARENHAS E ORIENTADA PELO PROF. DR.
CARMINO ANTONIO DE SOUZA.**

Assinatura do Orientador

Campinas

2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

M373i Mascarenhas, Cintia do Couto, 1982-
Identificação e investigação de genes diferencialmente expressos entre
pacientes com leucemia mielóide crônica e indivíduos controle / Cintia do Couto
Mascarenhas. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Carmino Antonio de Souza.
Coorientador: Fernando Ferreira Costa.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Ciências Médicas.

1. Leucemia mieloide crônica. 2. Expressão gênica. I. Souza, Carmino
Antonio de, 1951-. II. Costa, Fernando Ferreira, 1950-. III. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Identification and investigation of the differentially expressed genes in
patients with chronic myeloid leukemia and controls

Palavras-chave em inglês:

Chronic myeloid leukemia

Gene expression

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Clínica Médica

Banca examinadora:

Carmino Antonio de Souza [Orientador]

Francisco Jose Penteado Aranha

Carmen Silvia Passos Lima

Monika Conchon Ribeiro de Melo

Maria de Lourdes Lopes Ferrari Chauffaille

Data de defesa: 05-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

CINTIA DO COUTO MASCARENHAS

Orientador (a) PROF(A). DR(A). CARMINO ANTONIO DE SOUZA

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). CARMINO ANTONIO DE SOUZA
 2. PROF(A). DR(A). CARMEN SILVIA PASSOS LIMA
 3. PROF(A). DR(A). FRANCISCO JOSÉ PENTEADO ARANHA
 4. PROF(A).DR(A). MONIKA CONCHON RIBEIRO DE MELO
 5. PROF(A).DR(A). MARIA DE LOURDES LOPES FERRARI CHAUFFAILLE
- 

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas

Data: 05 de julho de 2013

Dedico

Aos meus amados e insubstituíveis
Pais Carmênio, Wilma, Thé e Elenice,
Aos meus irmãos Janaína, Edgard e Yan,
Ao meu esposo Leonardo,
Aos meus sogros Willmar e Edna
Por estarem ao meu lado em todos os
momentos, por acreditarem em mim e em meus
sonhos, pela paciência, amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

A todos os pacientes e controles que contribuíram para que o projeto saísse da teoria e se tornasse real.

À minha querida família, que foi meu arrimo durante toda a minha trajetória nesses anos que estive em Campinas. Sempre me apoiando, incentivando e não deixando que eu desistisse dos meus objetivos.

Ao meu amado esposo que foi sempre tão carinhoso, atencioso, companheiro e paciente comigo. Sempre me admirando e me ajudando em tudo que fosse necessário.

Ao meu orientador Dr. Carmino Antonio de Souza, por sua orientação na realização deste trabalho. Agradeço a sua compreensão, confiança, as oportunidades oferecidas e o privilégio de trabalhar ao seu lado durante todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa, pela orientação neste trabalho, pela disponibilidade e apoio em seu laboratório.

À amiga e professora Dra. Maria José Nascimento Brandão por ser, para mim, uma mãe em Campinas.

À Dra. Katia e Dra. Fabíola pelo apoio, entusiasmo, sugestões, discussões e soluções para todos os obstáculos, sempre prontas para me ajudar. Agradeço-as por fazer parte da minha formação.

Ao professor Dr. Fernando Araripe Torres da UNB por me acolher prontamente em seu laboratório.

Ao professor Dr. Anderson Ferreira da Cunha da UFSCAR por seus ensinamentos.

Ao Dr. Francisco José Penteado Aranha (O Caixeiro Viajante) pelos bons conselhos e amizade desde que me conheceu ainda na pesquisa clínica ou desde o início de minha odisséia. Pela participação na banca tornando aquele um momento tão lúdico e prazeroso.

A algumas pessoas especiais que se tornaram para mim, mais que amigos, praticamente irmãos, existindo o sentimento mútuo de fraternidade. Gustavo Lourenço, Maria Emília, Sheley Gambero e família, Ana Flavia Brugnerotto e família, Luciana Holanda, José Carlos Silva, Maria Helena de Almeida, Daniela Cardozo, Thaysa Fernanda, Manoela Ortega, Renata Proença e Mariane Flores foram fundamentais para que este trabalho fosse iniciado e concluído, pelas incontáveis horas de ajuda, pelos ensinamentos e amizade, o que tornou possível a vida longe da minha família.

Ao Renato Borges e Mireille Terra amigos de longa data sempre tão atenciosos e prestativos!

A toda equipe da SRD que, por todos esses anos que estive ausente de Brasília, cuidou do Leo com tanto carinho, amizade e compreensão tornando os dias dele mais felizes!

Aos quatro amigos - Renato Borges (mais uma vez o Renatão), Marcelo Castro, Hugo Murici e Leonardo Queiroz (hoje meu esposo) - que juntos saíram de Goiânia e se mudaram para Campinas em busca de um sonho que hoje é realidade, fazendo com que surgisse em mim a vontade de seguir o mesmo caminho!!!!

A todos os membros da banca, titulares e suplentes, por participar da banca me dando sugestões tão profícuas e me mostrando como pensar e introduzir o assunto de maneiras diferentes e de forma mais palatável para que o autor e seus interlocutores sempre estivessem em uma conversa franca e aberta, e um terceiro leitor pudesse também entrar nesta conversa.

Aos colegas do Hemocentro, do laboratório do Dr.Fernando Costa, Dra. Sara Saad e Dra. Joyce Bizzacchi pela vontade e prontidão para ajudar sempre, além de me proporcionar vários momentos de lazer, descontração e risadas. Aqui eu não poderia citar nomes porque fatalmente eu me esqueceria de alguém. O meu muito obrigada a todos!

À equipe de pesquisa clínica pela ajuda com os pacientes.

À toda equipe dos laboratórios de biologia molecular, citogenética, hematologia, onco-hematologia, e citometria de fluxo.

Agradeço imensamente a todos aqueles que contribuíram e participaram deste trabalho e a todos que depositaram seus votos de confiança em mim.

Às agências financiadoras **FAPESP**, **CNPq** e **INCT** do sangue.

“... quantas coisas, seria uma tese? Ou uma colcha de métodos de biologia molecular? Parecia o retorno de Penélope, esposa de Ulisses que ficara por muito tempo na Guerra de Tróia, sua esposa sempre tecendo algo e nunca terminava e só se casaria novamente quando terminasse esse tecido. Você é, para mim, Penélope e Ulisses. Li sua odisséia, sua viagem, não de retorno, mas de entrada no universo da ciência. Desculpe-me por esta apropriação de um discurso de um cronista de TV, mas não resisti a estas metáforas...”

Caixeiro viajante

Francisco José Penteado Aranha

Em 05 de julho de 2013

RESUMO

A elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na fisiopatologia e tratamento das doenças hematológicas, bem como no entendimento do perfil de expressão gênica das linhagens celulares leucêmicas, tem sido objeto de numerosas investigações. Com o uso da técnica SSH (*Subtractive Supression Hybridization* ou Biblioteca Subtrativa Supressiva) foi possível identificar importantes genes que se encontram diferencialmente expressos em granulócitos de pacientes com Leucemia Mielóide Crônica e indivíduos controle. Foram encontrados 39 genes superexpressos e 173 com expressão diminuída em células de LMC. Ao relacionar esses genes com vias metabólicas que estão reguladas positiva (expressão aumentada) ou negativamente (expressão diminuída) nessa doença, verificou-se que a maioria dos genes estavam relacionados com a regulação de NF- κ B, AKT, o Interferon e a IL-4 em células de controle. Entre os genes superexpressos encontrados na LMC, foi observado o *SEPT5*, *RUNX1*, *MIER1*, *KPNA6* e *FLT3*, enquanto *PAN3*, *TOBI* e *ITCH* estavam com expressão diminuída nessa doença em comparação com indivíduos controle. O *TOBI* se mostrou promissor, uma vez que é um gene supressor tumoral, pode estar envolvido na proliferação de células leucêmicas e interage com vários outros genes encontrados neste estudo. Assim, devido à grande heterogeneidade de funções relacionadas com a expressão desse gene, foi investigada a relação entre a expressão de mRNA e as respostas aos ITK's na LMC. A avaliação foi realizada por PCR em tempo real em doentes com CCgR, PCgR, MINCgR e NOCgR após tratamento com TKI's e os resultados foram comparados com a expressão em granulócitos de indivíduos controle, observando que os pacientes NOCgR têm uma expressão de *TOBI* significativamente inferior em comparação com doadores saudáveis e pacientes que alcançaram RCgC. Ao comparar pacientes não resistentes e resistentes a diferença foi significativa. Esses resultados sugerem que a expressão diminuída de *TOBI* em pacientes NOCgR pode ser indicativo de desregulação da apoptose e de vias de sinalização importantes nessa doença incluindo a via da AKT, conduzindo assim a resistência a ITK's nesses pacientes. Outro objetivo deste trabalho foi caracterizar a função dos genes *TOBI* e *SEPT5* nos processos celulares e vias de sinalização de apoptose, proliferação, migração e ciclo celular em linhagens celulares leucêmicas. Ao realizar o silenciamento desses genes (utilizando

partículas lentivirais) notou-se que o silenciamento de *TOBI*, como já descrito na literatura em outras doenças, interfere na proliferação celular, clonogenicidade, apoptose, ciclo celular e expressão de proteínas importantes da cascata de sinalização, o que salienta sua importância em células *BCR-ABL* positivas. Já o gene *SEPT5* ao ser silenciado leva a algumas alterações como a apoptose e ciclo celular. Nesse contexto, o silenciamento destes genes chama atenção para as possibilidades de controle da proliferação celular, apoptose, ciclo celular e clonogenicidade em células *BCR-ABL* positivas. Foi realizada a avaliação da expressão desses genes em células de sangue periférico e medula óssea de pacientes com LMC e indivíduos controles, linhagens celulares de câncer humano e linhagens de murino. Os resultados mostraram um aumento significativo na expressão do gene *SEPT5* em todos os tipos celulares analisados em pacientes com LMC. O mesmo padrão foi observado em células de murino que possuem a mutação T315I e em células humanas que possuem a translocação t(9;22) e estão relacionadas com a fase blástica da doença [K562, KU812, NALM]. Quando avaliada a expressão do gene *TOBI* nota-se diminuição em todos os tipos celulares analisados em pacientes com LMC e em células BaF3^{T315I}. Também foi observada uma baixa expressão em células com a t(9;22) e estão relacionadas com a fase blástica da doença [K562, KU812, NALM] quando comparadas a expressão em medula óssea controle. Outro resultado interessante foi obtido a partir da análise de adesão celular em granulócitos de pacientes com LMC e controles, evidenciando a diminuição da adesão em granulócitos de pacientes com LMC em relação aos de controles, levando a hipótese de que essa alteração nas propriedades adesivas dos granulócitos em pacientes com LMC pode estar diretamente ligada à liberação de células jovens pela matriz da medula óssea. A criação de estratégias que levam ao melhor entendimento da fisiopatologia da doença e avanço no tratamento da LMC deve ser focada em vários genes alvos e não apenas no *BCR-ABL*, pois no desenvolvimento da LMC há a ativação e desativação de várias vias de sinalização celular. Os resultados deste estudo podem ajudar na melhor compreensão dessas vias e também para identificar outros genes e vias úteis para a melhora no manejo terapêutico e criação de novas drogas para o tratamento dessa doença.

ABSTRACT

The elucidation of the molecular mechanisms involved in the pathophysiology and treatment of blood disorders, as well as the understanding of genes expression profiling of leukemia cell lines has been the focus of numerous investigations. The use of the SSH (Suppression Subtractive Hybridization Library or Suppression Subtractive) technique made available the identification of important genes which are differentially expressed in granulocytes from patients with chronic myeloid leukemia (CML) and healthy controls. 39 genes overexpressed were found, and 173 with decreased expression in CML cells. When correlating these genes with metabolic pathways that are regulated positively (increased expression) or negatively (decreased expression) in this disease, it was found that most of the genes were related to the regulation of NF- κ B, AKT, Interferon and IL-4 in control cells. The following genes were found overexpressed in CML: *SEPT5*, *RUNX1*, *MIER1*, *KPNA6* and *FLT3*, while *PAN3*, *TOB1* and *ITCH* were found with decreased expression in this disease compared with controls. The *TOB1* gene showed promising since it is a tumor suppressor, may be involved in the proliferation of leukaemic cells and interacts with several others genes found in this study. Thus, due to the great heterogeneity of functions related to this gene, was investigated the relationship between mRNA expression and TKI's responses. The evaluation was performed by real time PCR in patients with CCgR, PCgR, MINCgR and NOCgR after treatment with TKI and healthy controls. Was observed that patients that have NOCgR, the *TOB1* expression is significantly lower compared with healthy donors and patients who achieved CCgR. When comparing non-resistant and resistant patients the difference also was significant. These results suggest that reduced expression of *TOB1* in NOCgR patients may indicate apoptosis deregulation and changes in important signaling pathways of CML including the Akt pathway, thereby leading to TKI's resistance of these patients. Another aim of this work was to characterize the function of *TOB1* and *SEPT5* in cellular processes and signaling pathways of apoptosis, proliferation, migration and cell cycle in leukemic cell lines. After the silencing of these genes (using lentiviral particles), was noted that the silencing *TOB1* – as described in the literature for other diseases – interferes in cell proliferation, clonogenicity, apoptosis, cell cycle and in expression of important proteins at signaling cascade, which emphasizes its importance in BCR-ABL positive cells. The *SEPT5* silencing leads to some changes such as apoptosis and cell cycle. In this context, the silencing of these genes leads to attention of possibilities of control of cell proliferation, apoptosis, cell cycle and cell clonogenicity in BCR-ABL positive cells. Was assessed the expression of these genes in cells from peripheral blood and bone marrow of CML patients and controls, as well in human and murine cell lines. Results showed a significant increase in *SEPT5*

gene expression in patients with CML in all cell types evaluated. The same profile was observed in murine cells BAF3^{T3151} and in human cells having the translocation t (9; 22) been related to blast crisis [K562, KU812, NALM]. When measuring expression of *TOBI*, was noted decrease in all cell types studied in CML patients and cells BaF3^{T3151}. Another interesting result was obtained from the analysis of cell adhesion at granulocytes in CML patients and controls which showed decreased adhesion of granulocytes in CML patients compared to controls, leading to the hypothesis that the change in adhesive properties at CML can be directly linked to the release of young cells by bone marrow. The creation of strategies that lead to better understanding of the pathophysiology of the disease and advance in the treatment of CML should be focused on several target genes and not only in BCR-ABL, since in the development of CML there is an activation and deactivation of multiple signaling pathways . The results of this study may help to better understand these pathways and also to identify other genes and pathways useful for improving the management and development of new therapeutic drugs to treat this disease.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABL: *Abelson Leukemia Virus*

ACA: Anormalidades cromossômicas adicionais

Activation loop ou A-loop: Alça de ativação

α -INF: Alfa- interferon

Alça P ou P-loop: Alça do fosfato

AMN 107: Tasygna® ou Nilotinibe

ATP: Adenosina trifosfato

Akt - *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog*

BAD - *BCL2-associated agonist of cell death*

BAX - *BCL2-associated X protein*

BCL2 - *B-cell CLL/lymphoma 2*

BCR-ABL - *Breakpoint cluster region-abelson*

BCR: *Breakpoint Cluster Region*

BCR-ABL: Proteína híbrida resultante da translocação do cromossomo 9 e 22

BLASTN: Banco de dados de nucleotídeos

BLASTX: Banco de dados de proteínas

BMS: Bristol Myers Squib

BMS-354825: Sprycel® ou dasatinibe

BSA: Bovine serum albumin

C (PK5): Proteína quinase

CB: Crise blástica

cDNA: DNA complementar

CEP: Comitê de ética em pesquisa

CONEP: Comitê nacional de ética em pesquisa

CSTI571: Mesilato de imatinibe

Ct: Ciclo threshold

CMSP - Célula mononuclear de sangue periférico

CRKL - *V-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like*

DA: Dasatinibe

DNA - *Desoxiribonucleic Acid*

DEPC: Dietilpirocarbonato

DNA: Desoxiribonucleic acid

dNTP's: desoxirribonucleotídeos trifosfatados

DRM: Doença residual mínima

DTT: Dithiothreitol

E: Eficiência da amplificação

EDTA: Àcido tetracético etilenediamina

ESTs: Expressed sequence tags

Epo - eritropoetina

EpoR - Receptor de eritropoetina

ERK - *extracellular signal-regulated kinase*

F: Foward ou sense

FA: Fase acelerada

FC: Fase crônica

Fgr: Quinase da família Scr

FITC: Fluorescein

FITC - *Fluorescein Isothiocyanate*

Grb2 - *growth factor receptor-bound protein 2*

gDNA: DNA genômico

GenBank: Banco de dados de genes

GI: Número de identificação do gene

hRNA - *small short Ribonucleic Acid*

Hck: Quinase da família Scr

IBMTR: International bone marrow transplant registry

IM: Mesilato de imatinibe

ITK: Inibidores de tirosina quinase

JAK: Janus quinase

KM: Kaplan-Meier

LB: Lysogeny broth

LMC: Leucemia mielóide crônica

Lyn: Quinase da família Scr

LD PCR: *long distance PCR*

LMA: Leucemia mieloide aguda

MAPK: *mitogen-activated protein kinases*

MOI: *Multiplicity of infection*

MON: Medula óssea normal

MTT: *Methylthiazoletetrazolium*

MI: Mesilato de Imatinibe

M-BCR: Major breakpoint cluster regions

m-BCR: Minor breakpoint cluster regions

mRNA: RNA mensageiro

NI: Nilotinibe

NTC: Controles negativos

OCT-1: Organic cation transporter, member 1

OMS: Organização mundial de saúde

ORFs: Open reading frames

OS: Overall survival

pb: Pares de bases

PBS: Phosphate buffer solution

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PD: Progressão de doença

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas

Ph: Cromossomo Philadelphia

PS: Penicilina/estreptomicina

P70S6K: *70 kDa ribosomal protein S6 kinase 1*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PI: *Propidium iodide*

PI3K: *phosphoinositide-3-kinase*

Q: Quantidade de expressão

qPCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real

RNA: *Ribonucleic Acid*

R: Reverse ou anti-sense

RCC ou CCgR: Resposta citogenética completa
RCM ou MCgR: Resposta citogenética maior
RCP ou PCgR: Resposta citogenética parcial
MINCgR: Resposta citogenética menor
NOCgR: Sem resposta citogenética
RHC ou CHR: Resposta hematológica completa
RHP ou PHR: Resposta hematológica parcial
RMC: Resposta molecular completa
RMM: Resposta molecular maior
RPMI: Roswell park memorial institute
SAGE: Serial analysis of gene expression
SCF: Fator de células tronco
SFB: Soro fetal bovino
SKI-606: Bosutinibe
Src-PTK: Proteína tirosina quinase da família Src
SSH: Subtractive suppression hybridization
TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido
TK:tirosina quinase
Tm: Temperatura de *melting*
TMO: transplante de medula óssea
UA: Unidades arbitrárias
 μ -BCR: micro-breakpoint cluster regions

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação esquemática da ativação das vias de sinalização por BCR-ABL. Diagrama simplificado das associações entre o BCR-ABL e proteínas de sinalização. (adaptado de Deininger *et al.*,2000(Deininger, Goldman et al. 2000) e Kharas e Fruman, 2005(Kharas and Fruman 2005).63
- Figura 2.** Vias metabólicas do *BCR-ABL*. A. Visualização das vias de sinalização e rede de interação e de alguns genes relacionados. Dados de expressão gênica global de linhagem celular eritroleucemica K562, tirado do banco de dados público (GenMAPP). Em vermelho estão mostrados os genes mais expressos e em verde os genes menos expressos em células K562. Em B. visualizamos a rede de interação direta e indireta associada ao *BCR-ABL* que foi construído utilizando dados de expressão gênica global e visualizados pelo IPA. Os genes *up-regulation* são mostrados em vermelho e genes *down-regulation* são mostrados em verde. Adaptado de (Panigrahi, Stetefeld et al. 2012)......65
- Figura 3:** Eventos moleculares que conduzem à expressão do fenótipo da LMC. Um dos importantes eventos moleculares que ocorrem após a formação do oncogene BCR-ABL é a diminuição da adesão celular (Adapatada de Frazer, Irvine et al., 2007).....67
- Figura 4:** O sangue periférico foi submetido ao sistema de gradiente de Ficoll-Hypaque de densidade 1,077g/L e 1119g/L e centrifugado para que ocorresse a separação.87
- Figura 5:** Esquema mostrando como foram selecionadas as populações de granulócitos por citometria de fluxo para verificação da contaminação com linfócitos.88
- Figura 6:** Análise de citometria de fluxo para certificação da pureza da amostra de granulócitos com marcador de superfície CD45 FITC. No quadrante A observa-se 98,77% de granulócitos e contaminação de 1,23% de linfócitos em uma amostra de controle sadio e no quadrante B 99,37% de granulócitos e contaminação com 0,63% de linfócitos em um paciente com LMC.88
- Figura 7:** Esquema das etapas envolvidas na construção das Bibliotecas Subtrativas. (A) Síntese dos cDNAs, digestão com *RsaI* dos cDNAs e ligação dos adaptadores; (B) 1^a hibridização; (C) 2^a hibridização; (D) 1^a amplificação dos transcritos; (E) 2^a amplificação dos transcritos.89

Figura 8: Qualidade dos RNAs. Os RNAs de granulócitos de indivíduos controles (CTRL) e de pacientes com LMC visualizadas em gel desnaturante. Observa-se as subunidades 28S e 18S. PM – peso molecular (100pb).	90
Figura 9: Análise da Síntese de cDNAs. Amplificação do gene β -actina nas amostras de cDNAs de indivíduos controles (CTRL) e pacientes com LMC. PM – peso molecular (100pb).	91
Figura 10: Padronização do número ótimo de ciclos da LD PCR. Os ciclos 29 e 32 foram selecionados como ciclo ótimo para as populações CTRL e LMC, respectivamente. PM – peso molecular 100pb; CTRL – amplificação da amostra referente ao cDNA do <i>pool</i> de RNAs dos controles; LMC – amplificação da amostra referente ao cDNA do <i>pool</i> de RNAs dos pacientes com LMC.	92
Figura 11: Digestão dos cDNAs com RsaI e purificação. (A) cDNA digerido. (B) cDNA purificado. PM – peso molecular (100 pb); CTRL D –controle digerido; CTRL ND – controle não digerido; LMC D –LMC digerido; LMC ND – LMC não digerido.....	94
Figura 12: 1ª (PCR) e 2ª (Nested PCR) Amplificações do cDNAs subtraídos utilizados na construção das bibliotecas. PM – peso molecular de 100pb; CTRL SUB – cDNA controle pós-subtração; CTRL NÃOSUB – cDNA controle não subtraído; LMC SUB – cDNA LMC pós-subtração; LMC NÃOSUB – cDNA LMC não subtraído.....	96
Figura 13: Amplificação de alguns dos inóculos positivos para o inserto de interesse após clonagem.	97
Figura 14: Eficiência de amplificação de alguns dos primers <i>GAPDH</i> (A), β - <i>ACTINA</i> (B), <i>TOB1</i> (C), <i>GP1BA</i> (D), <i>PAN3</i> (C), <i>SEPT5</i> (D).....	100
Figura 15: Categorização dos genes diferencialmente expressos. Genes diferencialmente expressos entre as bibliotecas de controles e LMC de acordo com as vias de sinalização obtidas pela análise de bioinformática utilizando o programa Ingenuity®.....	103
Figura 16: Exemplo de vias metabólicas encontradas na biblioteca controle, analisando com o Ingenuity Pathway Software. Observa-se uma relação funcional entre os genes diferencialmente expressos (cinza) e outros genes (branco) que não foram encontrados nas bibliotecas deste estudo, mas que regulam genes que foram encontrados.....	104

- Figura 17:** Exemplo de vias metabólicas encontradas na biblioteca de LMC, analisando com o Ingenuity Pathway Software. Observa-se uma relação funcional entre os genes diferencialmente expressos (cinza) e outros genes (branco) que não foram encontrados nas bibliotecas deste estudo, mas que regulam genes que foram encontrados..... **105**
- Figura 18:** Validação da biblioteca de granulócitos de controles por qPCR, foram utilizadas as mesmas amostras nas duas técnicas. Expressão gênica calculada por $2^{-\Delta\Delta Ct}$. β -ACTINA e GAPDH utilizados para a normalização. *MIER1* não foi validado.. **106**
- Figura 19:** Validação da biblioteca de granulócitos de pacientes com LMC por qPCR, foram utilizadas as mesmas amostras nas duas técnicas. Expressão gênica calculada usando $2^{-\Delta\Delta Ct}$. β -ACTINA e GAPDH foram utilizados para a normalização. *KPNA6* não foi validado. **106**
- Figura 20:** Análise da expressão gênica em granulócitos de indivíduos controles comparada a de pacientes com LMC a partir do qPCR usando os controles endógenos β -Actina e GAPDH. A mediana é identificada por uma linha na figura. Utilizado teste de Mann-Whitney, valor de $P \leq 0,05$ significativo. *KPNA6* não teve valor significativo. **108**
- Figura 21:** Expressão gênica de granulócitos de indivíduos controles comparada a de pacientes com LMC a partir do qPCR usando os controles endógenos β -Actina e GAPDH. A mediana é identificada por uma linha na figura. Utilizado teste de Mann-Whitney, valor de $P \leq 0,05$ significativo. *MIER1* apesar de ter valor de p significativo não foi validado de acordo com o resultado encontrado na *SSH* **109**
- Figura 22:** Expressão do gene *TOBI* em granulócitos de pacientes com LMC e controles. Os pacientes foram estudados de acordo com a resposta citogenética completa (CCgR), resposta citogenética parcial (PCgR); resposta citogenética menor (MINCgR) e sem resposta citogenética (NoCgR). β -Actina e GAPDH foram utilizados para a normalização. A mediana é identificada por uma linha horizontal na figura. Teste de Mann-Whitney ($P \leq 0,05$). Dois pacientes não foram inseridos nessa análise devido ao tempo de início do tratamento. **110**

- Figura 23:** Comparação do nível de *TOBI* em granulócitos de controles sadios e de pacientes com LMC em fase crônica em uso de imatinibe. β -Actina e GAPDH foram utilizados para a normalização. Dois dos pacientes com resposta citogenética completa não estavam em uso de imatinibe. A mediana é identificada por uma linha horizontal na figura. Teste de Mann-Whitney, $P \leq 0.05$ significativo. **111**
- Figura 24:** Investigação da expressão de *TOBI* em pacientes responsivos e resistentes a ITK's. β -Actina e GAPDH foram utilizados para a normalização. A mediana é identificada por uma linha horizontal na figura. Teste Mann-Whitney, $P \leq 0.05$ significativo. **111**
- Figura 25:** O gene NF κ B tem sua regulação alterada em indivíduos com LMC. **113**
- Figura 26:** Esquema mostrando como ocorre a regulação de importantes genes em controles e LMC. **113**
- Figura 27:** Esquema dos possíveis mecanismos de atuação de *TOBI* em *PTEN* e nas vias AKT e ERK/MAPK. A- *TOBI* atua sobre *PTEN* que por sua vez atua sobre PI3K que está ligado a *EGF* e seus receptores agem em AKT e ERK/MAPK levando a ativação do gene NF κ B aumentando a expressão de Ciclina D1 e MMP's. AKT inibe a expressão de β -Catenina. B- *TOBI* ativa *SMAD4* que passa a inibir β -Catenina em câncer gástrico. C- A inibição de *TOBI* induz a fosforilação de AKT e consequente aumento de β -Catenina em câncer gástrico. D- A hipótese é que também em LMC *TOBI* atue sobre essas vias de sinalização a partir de sua ativação pelo *BCR-ABL*. **118**
- Figura 28:** Mecanismo de ação da interferência de RNA a partir de shRNAs. **123**
- Figura 29:** Esquema da cultura das linhagens celulares K562, NB4 e KU812- As culturas foram realizadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal e divididas em três garrafas, cada uma delas caracterizando um grupo experimental. 72 horas após a infecção com o lentivírus específico foi adicionado o antibiótico puromicina durante 14 dias com o objetivo de selecionar as células que receberam o inserto. Após o 14º dia, foi coletado um ponto inicial chamado 0h, posteriormente às 24hs e 48hs para a retirada de material para extração de RNA total e proteína. As células foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂. **125**

- Figura 30.** Sequência de fotografias tiradas no aparelho Cellix VenaFlux platform™ em um experimento de adesão de granulócitos em seis tempos diferentes em um campo... **130**
- Figura 31.** ShRNA específico para *TOB1* mediado por lentivírus resultou no silenciamento efetivo de *TOB1* em células K562 e NB4. Quantificação da expressão de *TOB1* nas células shTOB1 em relação a expressão das células shCTRL(Controle). Os gráficos de barras representam a média±DP de 3 experimentos independentes. * $P \leq 0.05$, teste *t student*. **132**
- Figura 32.** ShRNA específico para *SEPT5* mediado por lentivírus resultou no silenciamento efetivo de *SEPT5* em células K562, NB4 e KU812. Quantificação da expressão de *SEPT5* nas células shSEPT5 em relação a expressão das células shCTRL(Controle). Os gráficos de barras representam a média±DP de 3 experimentos independentes. * $P < 0.05$, teste *t student*. **132**
- Figura 33.** Análise do silenciamento gênico por Western Blot, a partir de extratos protéicos de células shTOB1, shSEPT5 e shControle. (A) A membrana foi incubada com anticorpos anti-TOB1 (45kDa), (B) anti-SEPT5 (40kDa) ou anti-Actina (42kDa) como controle da quantidade de proteína aplicada no gel. **133**
- Figura 34:** O silenciamento de *TOB1* aumenta a proliferação celular em células K562 e NB4 . A proliferação celular foi determinada pelo ensaio de MTT após 48 horas de incubação de células shTOB1 e shControle usando 0 e 1µM de imatinibe. Os resultados são apresentados como média± DP de seis replicatas e é representativo de 3 experimentos independentes. Teste *t*, *Mann-Whitney*, $P \leq 0.05$ **133**
- Figura 35.** O silenciamento de *SEPT5* não altera a proliferação celular em células K562, NB4 ou KU812. $P \leq 0.05$ foi considerado significativo, teste *t*, *Mann-Whitney*. **134**
- Figura 36.** O silenciamento de *TOB1* aumenta a clonogenicidade em células K562 (A) e NB4 (B). Colônias contendo células viáveis foram detectadas pela adição de MTT após 8 dias de incubação de células shTOB1 e shControle na ausência ou presença de mesilato de imatinibe (0 ou 1 µM) em meio metilcelulose. Foi considerado significativo $p \leq 0.05$, teste *t*, *Mann-Whitney*. **135**
- Figura 37.** O silenciamento de *SEPT5* não altera a clonogenicidade em células K562 (A), NB4 (B) e KU812 (C). As diferenças observadas nos gráficos não foram significativas pelo teste *t student*, pois o valor de *p* foi considerado significativo quando $p \leq 0,05$ **136**

Figura 38: Ciclo celular de células controles e células inibidas para <i>TOB1</i>	137
Figura 39: Ciclo celular de células K562 controle e silenciadas para <i>SEPT5</i>	138
Figura 40. O silenciamento de <i>TOB1</i> não altera a atividade de apoptose e necrose celular em células K562 (A) e NB4 (B). A apoptose foi detectada por citometria de fluxo em células marcadas com anexina-V e PI. As diferenças observadas nos gráficos não foram significativas pelo teste <i>t student</i> , pois o valor de $p > 0,05$	139
Figura 41: Citometria de fluxo para anexina V/PI em células K562 shCTRL e shTOB1. ...	139
Figura 42. O silenciamento de <i>SEPT5</i> diminui a atividade de apoptose celular em células K562 (A) porém o valor de p não foi significativo, e KU812 (C) com p significativo. Em NB4 (B) não houve alteração da atividade apoptótica. As diferenças observadas no gráfico A não foram significativas. Teste <i>t, Mann-Whitney</i> , significativo $p \leq 0.05$	140
Figura 43: Atividade apoptótica verificada por citometria de fluxo em células KU812 shCTRL e shSEPT5 marcadas com Anexina V/PI.	140
Figura 44. O silenciamento de <i>TOB1</i> diminui a atividade das caspases 3(A), 8(B) e 9(C) e tem efeito dose-resposta com o imatinibe. A atividade de caspases foi detectada por citometria de fluxo em células shControle e shTOB1 incubadas na ausência ou presença de imatinibe (0 e 1 μ M) por 48 horas. Foi considerado significativo $p \leq 0.05$, teste <i>t, Mann-Whitney</i>	141
Figura 45. O silenciamento de <i>TOB1</i> em células NB4 diminui a atividade da caspase 3(A), caspase 8 (B) e na caspase 9 (C) em presença ou ausência de imatinibe. Foi considerado significativo $p \leq 0.05$, teste <i>t, Mann-Whitney</i>	141
Figura 46: Avaliação do efeito do silenciamento de <i>SEPT5</i> na atividade das caspases 3, 8 e 9 em K562 na ausência ou presença de imatinibe (0 e 1 μ M). Foi considerado significativo $p \leq 0.05$, teste <i>t, Mann-Whitney</i>	142
Figura 47: Avaliação do efeito do silenciamento de <i>SEPT5</i> na atividade das caspases 3, 8 e 9 em NB4. Foi considerado significativo $p \leq 0.05$, teste <i>t, Mann-Whitney</i>	142
Figura 48: Avaliação do efeito do silenciamento de <i>SEPT5</i> na atividade das caspases 3, 8 e 9 em KU812. Foi considerado significativo $p \leq 0.05$, teste <i>t, Mann-Whitney</i>	143

- Figura 49:** O silenciamento de *TOB1* diminui a fosforilação de ERK 1/2, aumentou a fosforilação de AKT 1/2 e de P70S6K em células K562. *Western blot* de extratos protéicos de células shControle e shTOB1 para avaliação da expressão de fosfo-Akt, fosfo-P70S6K e fosfo-ERK1/2; as membranas foram re-incubadas com o anticorpo para detecção da proteína total respectiva. 143
- Figura 50:** O silenciamento de *TOB1* diminuiu a expressão de BAD e pBAD em células K562. *Western blot* de extratos protéicos de células shControle e shTOB1 para avaliação da expressão de BAD e fosfo-BAD; as membranas foram re-incubados com o anticorpo para detecção da proteína total respectiva. 144
- Figura 51:** O silenciamento de *TOB1* não modula a fosforilação de CRKL em células K562. 144
- Figura 52:** Expressão do gene *SEPT5* em células mononucleares (MONO), leucócitos totais (LEUCO) e medula óssea (MO) de indivíduos controle (CTRL) e pacientes com LMC avaliada por qPCR. As linhas horizontais representam a mediana. Foi considerado significativo $p \leq 0.05$, teste *t*, *Mann-Whitney*. 145
- Figura 53:** Análise da expressão do gene *SEPT5* em linhagens celulares de murino. 146
- Figura 54.** Expressão do RNAm do gene *SEPT5* em amostras de diferentes linhagens celulares linfoides, mielóides e de linfomas; além da expressão em medula óssea de indivíduos controle (MO). A linhagem K562 foi utilizada como amostra calibradora... 147
- Figura 55.** Expressão do gene *TOB1*, por qPCR, em células mononucleares (MONO), leucócitos totais (LEUCO) e medula óssea (MO) de indivíduos controle (CTRL) e pacientes com LMC. As linhas horizontais representam à mediana. Foi considerado significativo $p \leq 0.05$, teste *t*, *Mann-Whitney*. 148
- Figura 56.** Expressão do RNAm do gene *TOB1* em amostras de diferentes linhagens celulares linfoides, mielóides e de linfomas, além da expressão em medula óssea de indivíduos controle (MO). A linhagem K562 foi utilizada como amostra calibradora... 149
- Figura 57.** Análise da expressão do gene *TOB1* em linhagens celulares de murino. 149
- Figura 58:** Adesão de granulócitos (5×10^6 cls/mL) à fibronectina (20 μ g/mL) por 3 minutos, sob força de cisalhamento de 0,5 d/cm² e 37⁰C de indivíduos controle e indivíduos com LMC. O número de células aderidas foi determinado num campo de visão de 1600 X 1200 μ m². Teste *t student*, foi considerado valor significativo $p \leq 0.05$. 150

Figura 59. Adesão de granulócitos (5×10^6 cls/mL) à fibronectina (20 μ g/mL) por 3 minutos, sob força de cisalhamento de 0,5 d/cm ² e 37 ^o C de indivíduos em tratamento com inibidores de tirosina quinase. O número de células aderidas foi determinado em um campo de visão de 1600 X 1200 μ m ²	151
Figura 60: Representação esquemática das vias de sinalização por BCR-ABL. Possíveis caminhos para <i>TOB1</i> e <i>SEPT5</i> . Adaptado de Deininger <i>et al.</i> , 2000 e Kharas e Fruman, 2005.	153

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Características dos pacientes que participaram do estudo	84
Tabela II: Sequência de cada par de primers e concentração ótima utilizada para a amplificação de alguns genes diferencialmente expressos encontrados nas Bibliotecas Subtrativas.	99
Tabela III: Identificação de alguns genes encontrados nas SSHs. Os reads totais se referem ao número de vezes que o gene foi identificado, sendo descrito o número de vezes encontrado em cada uma das bibliotecas (reads CTRL ou reads LMC).	102
Tabela IV: Descrição das linhagens humanas usadas neste estudo.	121
Tabela V: Descrição das linhagens leucêmica utilizadas para o silenciamento.	124
Tabela VI. Efeito do silenciamento do gene <i>TOB1</i> nas fases do ciclo celular em K562	136
Tabela VII. Efeito do silenciamento do gene <i>TOB1</i> nas fases do ciclo celular em NB4.....	137
Tabela VIII: Efeito da inibição do gene <i>SEPT5</i> nas fases do ciclo celular em K562.....	137
Tabela IX: Efeito da inibição do gene <i>SEPT5</i> nas fases do ciclo celular em NB4	138
Tabela X: Efeito da inibição do gene <i>SEPT5</i> nas fases do ciclo celular em KU812	138

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	IX
RESUMO	XV
ABSTRACT	XIX
LISTA DE ABREVIATURAS	XXIII
LISTA DE FIGURAS	XXXI
LISTA DE TABELAS	XLVII
SUMÁRIO	XLIX
1. INTRODUÇÃO	55
A Leucemia Mielóide Crônica	57
Expressão Gênica em LMC	58
Leucemia mieloide crônica (LMC) e as vias de sinalização	61
Adesão de granulócitos.....	66
2. JUSTIFICATIVA	69
3. OBJETIVOS	73
Objetivos Gerais	75
Objetivos específicos.....	75
4. ASPECTOS ÉTICOS	77
5. CASUÍSTICA GERAL DO ESTUDO	81
CAPÍTULO I – CONSTRUÇÃO DAS BIBLIOTECAS SUBTRATIVAS SUPRESSIVAS E VALIDAÇÃO	85
Pacientes e Métodos	86
Pacientes	86
Separação dos granulócitos a partir de sangue periférico	86
Análise da separação dos granulócitos por citometria de fluxo	87
Biblioteca Subtrativa	89
Verificação da qualidade dos RNAs	90
Síntese e amplificação de cDNAs.....	90
Digestão com <i>RsaI</i>	92
Ligação dos Adaptadores.....	94
Hibridizações	94

Amplificação dos Transcritos	95
Clonagem, Amplificação e Sequenciamento	97
PCR em Tempo Real - qPCR	98
Padronização do PCR em Tempo Real	98
Análises Estatísticas	100
Resultados	100
Perfil da expressão dos genes em granulócitos de pacientes com LMC e controles sadios.....	100
Identificação e associação de genes em LMC	105
Discussão	112

CAPÍTULO II – *TOB1* E *SEPT5*: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO GÊNICA NA PROLIFERAÇÃO, CLONOGENICIDADE, APOPTOSE, CICLO CELULAR E VIAS METABÓLICAS; PERFIL DA EXPRESSÃO DESSES GENES EM LINHAGENS CELULARES HUMANAS E DE CAMUNDONGOS; E AVALIAÇÃO DA ADESÃO CELULAR DE GRANULÓCITOS DE PACIENTES E INDIVÍDUOS CONTROLE..... 119

Casuística e Métodos	120
Pacientes	120
Coleta da medula óssea.....	120
Processamento do material da medula óssea	120
Linhagens celulares humanas	120
Cultura das linhagens celulares BaF3 ^{wild type} , BaF3 ^{BCR-ABLp210} , BaF3 ^{T315I}	121
Padronização da concentração de Puomicina.....	121
Transfecção das células K562, NB4 e KU812 usando lentivírus	122
Culturas de linhagens celulares K562, NB4 e KU812.....	123
Avaliação do silenciamento por qPCR	125
Extração de RNA.....	125
Síntese de cDNA	126
Western blot.....	126
Methylthiazoletetrazolium (MTT).....	127
Ensaio de formação de colônia	128
Análises do ciclo celular.....	128
Avaliação de apoptose usando anexina-V e PI.....	128
Avaliação da atividade de Caspases 3, 8 e 9.....	129
Adesão celular em fluxo	129
Ensaio de adesão em fluxo e interpretação dos resultados	130
Resultados	130
Cultura e transfecção das linhagens celulares K562, NB4 e KU812	130
Avaliação do silenciamento dos genes por qPCR.....	131
Avaliação do silenciamento por Western blot	132
Avaliação da proliferação celular usando Methylthiazoletetrazolium (MTT).....	133
Ensaio de formação de colônia	134
Análises do ciclo celular.....	136
Avaliação da atividade de apoptose por marcação com anexina-V e PI.....	138
Avaliação da apoptose celular pela atividade das caspases 3, 8 e 9.....	140
Avaliação do efeito do silenciamento de <i>TOB1</i> , em células K562, nas vias de sinalização mTOR/AKT E MAPK.....	143
Avaliação do efeito do silenciamento do <i>TOB1</i> nas vias de apoptose celular e CRKL.....	144
Estudo da expressão dos genes <i>SEPT5</i> e <i>TOB1</i>	145
Expressão do gene <i>SEPT5</i>	145
Caracterização da expressão do gene <i>TOB1</i>	147
Adesão de granulócitos de controles e indivíduos com LMC.....	150
Discussão	151

6. CONCLUSÃO	157
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	161
8. ANEXOS	171
ANEXO I – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FCM/UNICAMP.....	173
ANEXO II – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	175

1. Introdução

A Leucemia Mielóide Crônica

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa na qual ocorre uma expansão clonal da célula progenitora hematopoética, desenvolvendo um quadro de hiperplasia mielóide, leucocitose, neutrofilia, basofilia e esplenomegalia. A principal característica é a presença do cromossomo Philadelphia (Ph) positivo (Brauer, Werth et al. 2007; Polampalli, Choughule et al. 2008).

O cromossomo Philadelphia foi descoberto em 1960 por Peter Nowell e David Hungerford, que notaram uma anormalidade no pequeno grupo G do cromossomo (Deininger 2008; Druker 2008; Jamieson 2008). Janet Rowley foi quem reconheceu, em 1973, que o cromossomo Ph era produto de uma translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22, nas regiões do braço longo (q34;q11.2), respectivamente (Polampalli, Choughule et al. 2008; Valencia, Cervera et al. 2009). Em 1984, identificou-se que o cromossomo Ph é formado a partir da transposição da sequência 3' do oncogene ABL1 (Abelson murine leukemia viral) no cromossomo 9, com a região 5' do gene BCR (Breakpoint Cluster Region) no cromossomo 22. O produto gerado a partir da fusão é o oncogene BCR/ABL, que produz uma proteína com elevada atividade tirosina quinase e está intimamente relacionada à patogenia da LMC (Frazer, Irvine et al. 2007; Koretzky 2007; Druker 2008).

O principal evento desencadeador da LMC é aparecimento do cromossomo Ph e consequente formação do oncogene BCR/ABL (Kantarjian, Melo et al. 2000; Valencia, Cervera et al. 2009). Assim, a proteína gerada tem atividade tirosina quinase sendo capaz de induzir a uma doença maligna, ativando múltiplos sinais citoplasmáticos e nucleares nas vias de transdução que influenciam no crescimento e sobrevivência das células hematopoiéticas (Kantarjian, Talpaz et al. 2006; Sessions 2007).

O gene híbrido BCR-ABL é derivado da fusão do BCR na localização denominada maior (M-bcr), sendo que a transcrição deste gene gera moléculas de mRNA quimérico, assim, as fusões das sequências do BCR e ABL são representadas pelas junções dos exons b3a2 (e14a2) e/ ou b2a2 (e13a2) (Kantarjian, Melo et al. 2000; Ohsaka, Shiina et al. 2002; Melo, Hughes et al. 2003). Este rearranjo que ocorreu leva a formação de proteína de fusão citoplasmática que pode ser a p210 ou p190, que são capazes de regular a atividade tirosina

quinase e são responsáveis pela patogenia da doença, por interferir na transdução de sinais de processos celulares básicos como a proliferação, aderência e apoptose (Kantarjian, Melo et al. 2000; Melo, Hughes et al. 2003).

Em alguns casos, a LMC pode ser resultante da quebra na região menor do gene BCR (m-bcr), de localização e1 e fusão com o ABL no nível do exon a2, levando a expressão do transcrito e1a2 que codifica a proteína 190-kDa (p190), geralmente relacionada a leucemia linfóide aguda (LLA) Ph, e em alguns casos de LMC pode ser predominante, ou co-expressar em baixos níveis com a p210 (Kantarjian, Melo et al. 2000; Melo, Hughes et al. 2003).

Outra quebra pode ocorrer na micro região (μ -bcr), e a fusão originada correspondente ao exon 19, com o segmento a2 do ABL, leva a expressão de um largo transcrito (e19a2), codificando a proteína 230-kDa (p230) sendo caracterizada por uma desordem mieloproliferativa e geralmente relacionada a leucemia neutrofílica crônica com cromossomo Ph (Kantarjian, Melo et al. 2000; Ohsaka, Shiina et al. 2002; Melo, Hughes et al. 2003).

A LMC corresponde cerca de 20% das leucemias que atingem a população adulta (Sessions 2007). Apesar das evidências, não há comprovação de relação da LMC com fatores hereditários e/ou geográficos, além disso a doença não pode ser prevenida (Quintas-Cardama and Cortes 2006). A idade média em que a doença se desenvolve varia entre 40 a 55 anos, com uma proporção de 2:1 entre os sexos masculino e feminino, respectivamente (Frazer, Irvine et al. 2007). O único fator de risco conhecido que pode ser relacionado ao desenvolvimento da LMC é a exposição a radiação ionizante. Por causa desse nexo causal, há aumento da prevalência em população com maior exposição a esse tipo de radiação (Kantarjian, Melo et al. 2000; Quintas-Cardama and Cortes 2006; Hamerschlak 2008).

Expressão Gênica em LMC

O conhecimento da expressão gênica e proteica é importânte na caracterização molecular de qualquer doença a ser estudada. Devido à base biológica da progressão da fase crônica para fase acelerada ou crise blástica ser mal compreendida na LMC, diversos estudos já foram feitos com o propósito de elucidar esses mecanismos moleculares. Vários

autores estudaram por microarray ou bibliotecas de cDNA a expressão gênica em LMC utilizando os diversos inibidores de tirosina quinase (TK) e identificando genes importantes para a terapêutica e condução da doença (Forrest, Jiang et al. 2008; Kim, Chun et al. 2008; Kroschinsky, Schakel et al. 2008; Schmidt, Gastl et al. 2008; Simanovsky, Berlinsky et al. 2008).

Usando *microarray* de DNA, Radich et al (2006) estudaram a expressão gênica e as mudanças associadas com a progressão e a resposta na LMC em 91 casos. Uma comparação da expressão dos genes encontrados na fase de crônica (FC), acelerada e blástica sugerem que a progressão da LMC é um processo que ocorre em duas fases, em vez de três etapas, passando da fase crônica para a crise blástica. Foi notável e potencialmente significativo na progressão da doença a desregulação de genes como *WNT*, o precursor da beta-catenin, a diminuição da expressão de *JunB* e *Fos*, desregulação de quinases alternativas, como Arg (Abl2), e expressão aumentada do gene *PRAME*. Estudos de pacientes com LMC que recaíram inicialmente após tratamento com imatinibe mostrou um padrão de expressão gênica estreitamente relacionado com a doença em fase avançada. Esses estudos indicam que vias metabólicas específicas podem ser exploradas como indicadores de prognósticos assim como novos alvos para terapia desta doença (Radich, Dai et al. 2006).

Um grupo de pesquisadores da Alemanha descreveu em 2006 algumas características gênicas que podem ajudar a explicar o comportamento agressivo da crise blástica (CB), realizando comparações entre os perfis de expressão gênica de células purificadas CD34⁺Ph⁺ de pacientes com diagnóstico recente de LMC em FC não tratada e de pacientes em CB, utilizando matrizes de oligonucleotídeo da Affymetrix. Dentre os 114 genes diferencialmente expressos encontrados, especialmente alguns desses genes se encontravam com expressão menor do que o esperado em pacientes com LMC. Eles são supressores de sinalização de citocina 2 (SOCS2), CAMPATH antigênio-1 (CD52). Quatro antígenos leucocitários humanos relacionados com os genes foram fortemente expressos na CB. Os dados sugerem que exista um perfil de expressão gênica comum em LMC-CB, isso proporciona novas perspectivas sobre o fenótipo de blastos associados com a doença e a progressão com alta malignidade (Zheng, Li et al. 2006).

Foram descritos estudos revelando que alguns pacientes podem ter resistência ao imatinibe antes de ser exposto ao tratamento. Tal resistência inata ao Mesilato de Imatinibe (MI) ainda não foi esclarecida, porém é conhecido que a sensibilidade ocorre em sub clones da linhagem celular KCL22, na qual ao ser exposta ao MI age inibindo a atividade do BCR-ABL e ainda induz a apoptose. Tipping et al descreveram a expressão gênica da linhagem celular KCL22 sensível e a resistente ao tratamento com MI, utilizando *microarray*. Foi detectada expressão diferencial de 39 genes que se correlacionam com o fenótipo de resistência ao imatinibe. As células resistentes mostraram vários genes superexpressos associados com a supressão da apoptose ou com um fenótipo alterado. Entre os genes diferencialmente expressos, correlacionando com resistência ao imatinibe, alguns sugerem que a ativação de vias alternativas mantêm a viabilidade e o crescimento, independentemente da atividade quinásica do BCR-ABL (Tipping, Deininger et al. 2003).

A introdução do ensaio de *Single Nucleotide Polymorfism* (SNP) *microarrays* permitiu a detecção de fatores (como alterações cromossômicas) ligados a malignidades hematológicas dentre outras doenças. Um grupo de Cleveland-USA, aplicou esta tecnologia para detectar alterações cromossômicas críticas e mostrar que o mapeamento sobrepondo regiões com segmentos mínimos pode ajudar a orientar a busca de mutações patogênicas conhecidas e desconhecidas em neoplasias hematológicas em geral (Dunbar, Gondek et al. 2008).

Ainda não foram realizados estudos de expressão gênica diferencial sobre os mecanismos celulares e moleculares ligados ao desenvolvimento e progressão da LMC em células da linhagem granulocítica. Os estudos, inclusive os citados anteriormente, na maioria das vezes revelam características ligadas a tipos celulares como as mononucleares ou CD34⁺, o que pode impedir a identificação da expressão gênica de genes envolvidos diretamente com uma importante linhagem celular acometida nessa doença.

Devido à importância do conhecimento da regulação gênica em células de linhagem leucêmica e ao conhecimento incompleto dessa regulação (Simanovsky, Berlinsky et al. 2008), foi proposto nesse estudo a construção de duas bibliotecas subtrativas de cDNA de células granulocíticas para avaliação dos genes diferencialmente expressos relacionados ao desenvolvimento e progressão da LMC.

Leucemia mieloide crônica (LMC) e as vias de sinalização

A rede de sinalização que é controlada pela proteína quinase BCR-ABL é complexa e altamente redundante (Deininger, Goldman et al. 2000), o que resulta em uma síndrome mieloproliferativa ocasionada pela proliferação descontrolada das células da medula óssea e inibição da apoptose celular (Tefferi and Vardiman 2008).

Esforços significativos estão sendo realizados para a compreensão dos mecanismos moleculares que ocorrem devido à ação do oncogene *BCR-ABL*, através da identificação das vias de sinalização que são afetadas pela sua atividade tirosina quinase.

Inúmeros substratos e ligantes de BCR-ABL têm sido identificados e o foco está dirigido para a investigação dos defeitos patológicos específicos que caracterizam a LMC (Druker 2008). Apesar da alta expansão na lista das vias de sinalização ativadas por BCR-ABL e da alta complexidade dessas vias metabólicas, todas as funções de transformação pelo *BCR-ABL* dependem de sua atividade tirosina quinase (Lugo, Pendergast et al. 1990).

Essa proteína pode ser inibida por pequenas moléculas sintéticas como imatinibe, o dasatinibe, o nilotinibe e o bosutinibe. Essas moléculas inibidoras da atividade tirosina da oncoproteína BCR-ABL induzem à diminuição no crescimento e proliferação celular, além de promoverem a apoptose em células BCR-ABL positivas (Druker, Sawyers et al. 2001).

O MI atua inibindo a proliferação de células que expressam BCR-ABL a partir da inibição das proteínas tirosina quinase. Inicialmente, foi utilizado em pacientes que apresentaram falha no tratamento com α -IFN, ou em fase acelerada (FA) ou CB (Druker, O'Brien et al. 2002). Esse composto é capaz de inibir a atividade tirosina quinase, das vias C-KIT, ARG (genes relacionados ao *ABL*), PDGFR e SCF, por competição no sítio de ligação da adenina trifosfato (ATP). Assim inibindo a capacidade dessas de fosforilar e ativar proteínas-alvo da cascata de sinalização da LMC (Druker, O'Brien et al. 2002; McFarland and Wetzstein 2009).

O Dasatinibe (DA) tem como alvo a as vias *ABL*, *PDGFR*, *KIT*, *FGR*, *FYN*, *HCK*, *LCK*, *Lyn*, *SRC*, *YES* e *EPHB4*. Ele é utilizado em pacientes que apresentem resistência ou intolerância ao MI, sendo capaz de superar os mecanismos de resistência, incluindo a sinalização alternativa que envolve as vias da família SRC quinase e superexpressão do MDR-1 (*Multidrug-resistance gene 1 protein*). Esse gene está intimamente relacionado ao

aumento do efluxo de MI a partir da célula cancerosa mediado por transportadores de membrana (Baccarani, Castagnetti et al. 2009; McFarland and Wetzstein 2009).

O Nilotinibe (NI) é um derivado do MI capaz de inibir a atividade tirosina quinase ABL, KIT, EPHB4 e do receptor do PDGFR, de forma mais potente e seletiva. Assim como o DA, é utilizado como segunda linha de tratamento (Baccarani, Castagnetti et al. 2009; McFarland and Wetzstein 2009). Estudos clínicos estão sendo realizados com o objetivo de avaliar o tempo e o tipo de resposta do NI em pacientes resistentes ao MI (Branford, Kim et al. 2012).

Entretanto, o desenvolvimento de resistência ou intolerância a esses inibidores são problemas encontrados no tratamento da LMC. Uma das causas de resistência se deve a aquisição das mutações no domínio da quinase BCR-ABL. O NI e o DA são sensíveis para a maioria das mutações que causam resistência ao MI, mas algumas mutações conferem resistência clínica contra o NI (Y253H, E255K/V, F359V/C) ou DA (V299L, T315A, F317L/I/V/C), ou aos três inibidores de TK (T315I) (Lange, Ernst et al. 2012). Diante disso, uma abordagem alternativa a qual faz uso de outros compostos que não se ligam diretamente à proteína BCR-ABL está sendo desenvolvida. Em vez disso, essas moléculas atuam sobre outras proteínas e/ ou genes que são regulados direta ou indiretamente por BCR-ABL e participariam da via de sinalização BCR-ABL e do processo de transformação maligna das células.

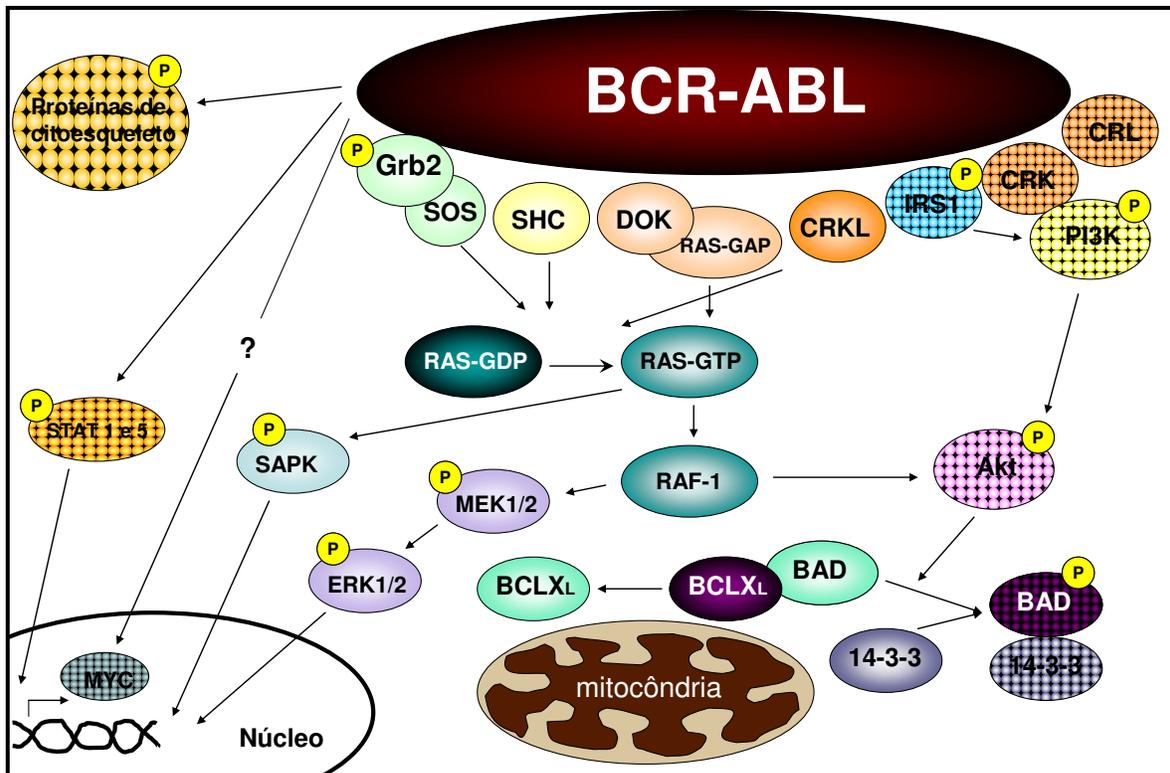


Figura 1: Representação esquemática da ativação das vias de sinalização por BCR-ABL. Diagrama simplificado das associações entre o BCR-ABL e proteínas de sinalização. (adaptado de Deininger *et al.*,2000(Deininger, Goldman *et al.* 2000) e Kharas e Fruman, 2005(Kharas and Fruman 2005).

Os mecanismos de proliferação, diferenciação e apoptose de células hematopoéticas normais e leucêmicas são regulados, dentre outros fatores, por estímulos extracelulares de citocinas e interações com o microambiente. A resposta a estes estímulos é transmitida da membrana celular ao núcleo através de vias de transmissão de sinalização celular, incluindo a via de JAK/STAT, RAS/Raf/MEK/ERK, e PI3K/Akt (Steelman, Pohnert *et al.* 2004; Kornblau, Womble *et al.* 2006). Na LMC as vias de sinalização mais importantes mediadas por BCR-ABL são Ras, STAT,PI3-K/Akt, NFκB e Myc (Baran and Saydam 2012).

A alteração da sinalização normal ocorre como resultado de mutações, alteração de expressão ou ativação dos componentes das vias de sinalização, com consequente alteração na regulação da proliferação, diferenciação, adesão e apoptose celular (Kantarjian, Sawyers *et al.* 2002). A ocorrência de leucemias, agudas e crônicas, resulta da combinação desses fatores (Reuter, Morgan *et al.* 2000; Gilliland and Tallman 2002; Steelman, Pohnert *et al.*

2004), e quando relacionados, esses fatores tornam mais importante o estudo da expressão e regulação de genes que possam interagir com o BCR-ABL levando ao aparecimento e/ou progressão da LMC e aquisição de resistência ao tratamento.

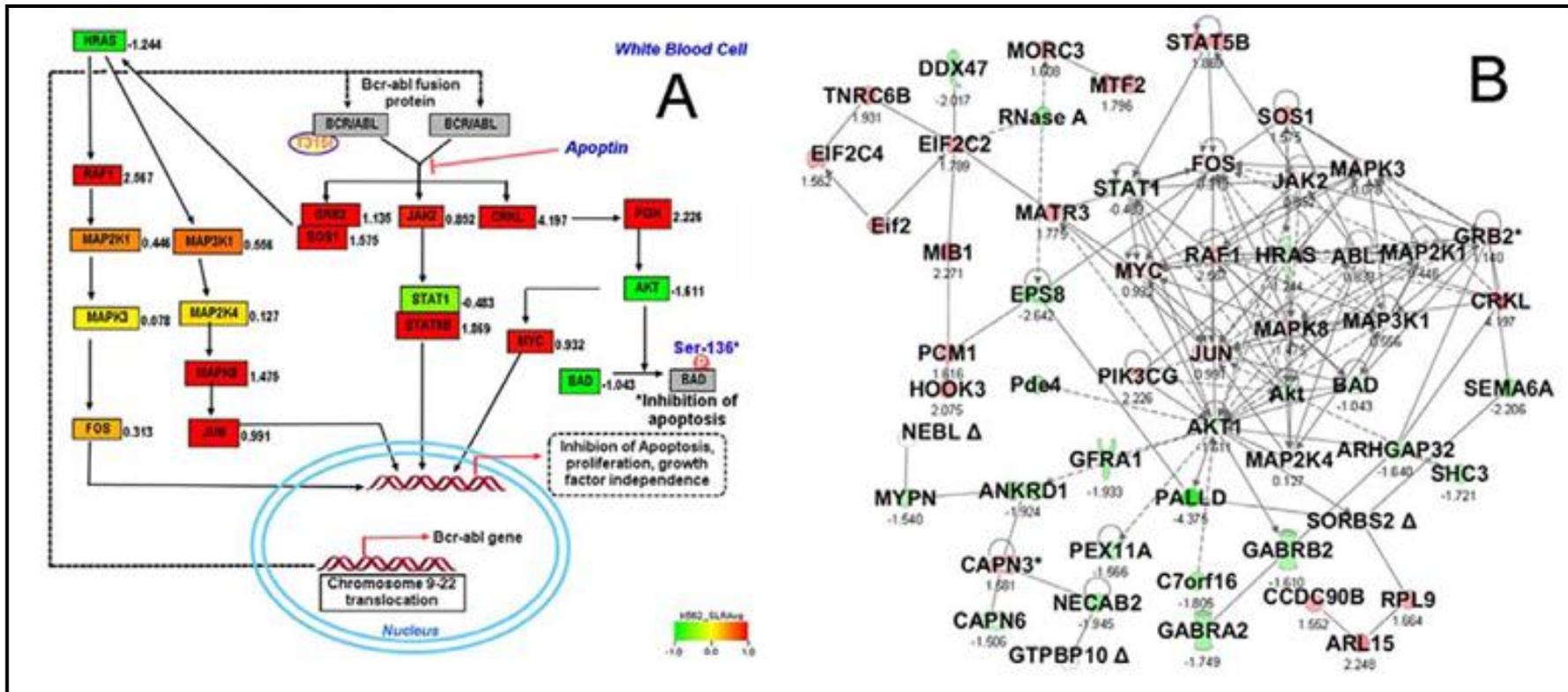


Figura 2. Vias metabólicas do *BCR-ABL*. A. Visualização das vias de sinalização e rede de interação e de alguns genes relacionados. Dados de expressão gênica global de linhagem celular eritroleucêmica K562, tirado do banco de dados público (GenMAPP). Em vermelho estão mostrados os genes mais expressos e em verde os genes menos expressos em células K562. Em B. visualizamos a rede de interação direta e indireta associada ao *BCR-ABL* que foi construído utilizando dados de expressão gênica global e visualizados pelo IPA. Os genes *up-regulation* são mostrados em vermelho e genes *down-regulation* são mostrados em verde. Adaptado de (Panigrahi, Stetefeld et al. 2012).

Adesão de granulócitos

O oncogene BCR/ABL diminui a dependência celular de fatores de crescimento externos pelo aumento da produção de interleucina-3 e altera as propriedades de adesão celular pela modulação da expressão e ativação de quinases de adesão e proteínas associadas (Kantarjian, Talpaz et al. 2006). Além disso, o oncogene também altera vias de sinalização relacionadas à porção SH1 levando a diminuição da adesão celular, porém com aumento da motilidade desta célula (Frazer, Irvine et al., 2007).

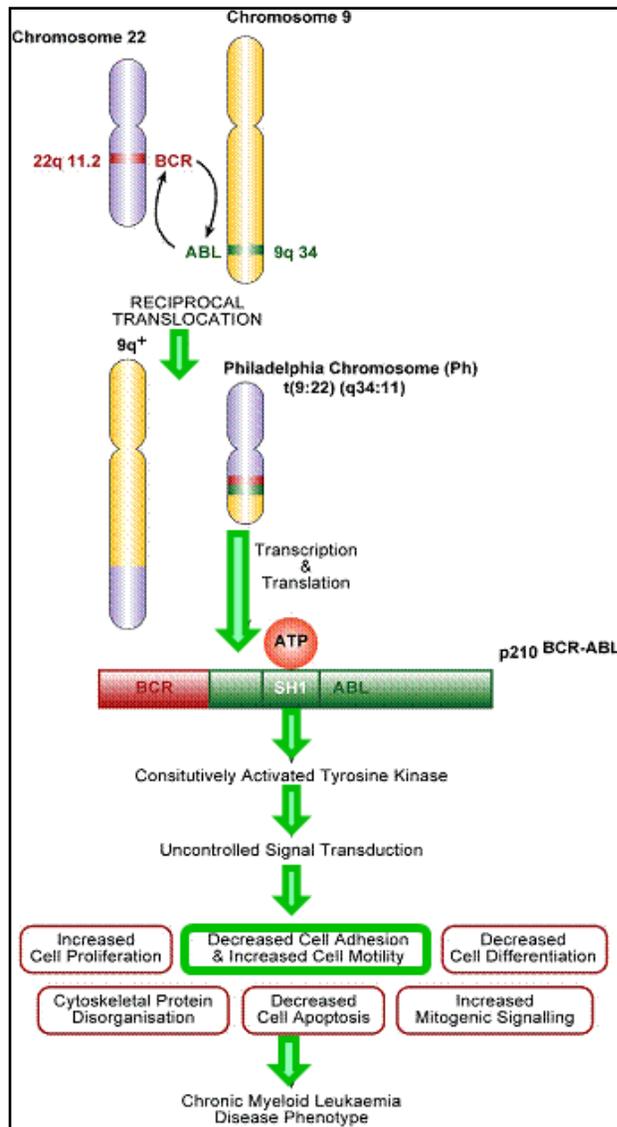


Figura 3: Eventos moleculares que conduzem à expressão do fenótipo da LMC. Um dos importantes eventos moleculares que ocorrem após a formação do oncogene BCR-ABL é a diminuição da adesão celular (Adapatada de Frazer, Irvine et al., 2007)

Os granulócitos chegam ao local de inflamação por aderir ao endotélio vascular ativado, deixar a circulação e migrar em direção ao tecido em processo inflamatório. Durante esse processo, eles são capazes de mobilizar grânulos citoplasmáticos e vesículas secretórias, que constituem um importante reservatório de proteínas antimicrobianas, proteases e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Também é mobilizada uma variedade de receptores de membrana para moléculas de adesão endoteliais, proteínas da matriz extracelular (MEC) e mediadores inflamatórios solúveis que serão liberados no espaço extracelular, gerando danos tanto locais (Baetta and Corsini 2010; Cascao, Moura et al. 2010). Depois de cessado esse estímulo, há a necessidade de reparo da lesão e o retorno ao estado homeostático.

Portanto, defeitos na função granulocítica, frequentemente, resultam em uma resposta anormal aos estímulos inflamatórios, gerando danos vasculares ou nos órgãos (Cascao, Moura et al. 2010). Foi descrito que as integrinas β possuem um importante papel na interação entre o estroma da medula e as células progenitoras, sendo que as células de LMC expressam uma variante $\beta 1$ que não foi encontrada em células progenitoras normais. Quando ligada aos seus receptores, essas integrinas são capazes de iniciar a transdução de sinais dentro ou fora do estroma. Além disso, a função das integrinas parece estar reduzida em células BCR-ABL (Deininger, Goldman et al. 2000).

2. Justificativa

Existem na literatura incontáveis estudos em LMC, abrangendo em sua totalidade as vertentes dessa doença o que torna difícil atender os pilares estratégicos de uma tese de doutorado. Como itens básicos, na tese, estão à revisão de literatura, argumentação e apresentação de resultados, profundidade de idéias e avanço dos estudos na área.

Um dos principais fatores que caracteriza a tese é a originalidade e quando se trata de estudos de expressão gênica diferencial ou global observa-se uma preocupação com as particularidades das células CD34+, células mononucleares ou leucócitos totais. E por que não dar importância aos granulócitos, células que se proliferam rapidamente e em grande quantidade na LMC?

Em 2003 foi descrito um fator de transcrição que atua na diferenciação rápida em granulócitos BCR-ABL+ (Tavor, Park et al. 2003). Em maio de 2013 foi publicado um trabalho avaliando a concentração de imatinibe em granulócitos (Kralj, Zakej et al. 2013).Entretanto até o momento nenhum trabalho com o foco sobre a expressão gênica diferencial *versus* granulócitos *versus* LMC foi publicado.

Em face disso, e dada à importância do conhecimento da expressão gênica, regulação das vias de sinalização e quaisquer mecanismos relacionados ao desenvolvimento e/ou progressão da LMC, bem como desenvolvimento de resistência ao tratamento, foi proposto neste trabalho à investigação da expressão gênica diferencial entre granulócitos de indivíduos sadios e de pacientes com LMC, além de uma análise pormenorizada da funcionalidade de alguns dos genes encontrados diferencialmente expresso entre as bibliotecas construídas.

Além disso, entender os mecanismos que levam ao desenvolvimento da doença, bem como o conhecimento da função de genes que ainda não foram relacionados com essa patologia, pode contribuir para um melhor esclarecimento das vias metabólicas envolvidas com o desenvolvimento e proliferação do clone leucêmico, além de possibilitar melhorias no desenvolvimento de novas terapias para LMC.

3. Objetivos

Objetivos Gerais

Identificação e investigação de genes diferencialmente expressos entre pacientes com LMC e indivíduos controle e avaliação de suas funções na fisiopatologia da doença.

Objetivos específicos

- ✓ Investigar a expressão gênica diferencial entre indivíduos controles e pacientes com LMC;
- ✓ Selecionar e validar genes diferencialmente expressos entre controles e LMC.
- ✓ Caracterizar a expressão dos genes escolhidos em linhagens celulares leucêmicas humanas.
- ✓ Caracterizar a função dos genes selecionados nos processos celulares e vias de sinalização de apoptose, proliferação, clonogenicidade e ciclo celular em linhagens leucêmicas BCR-ABL⁺.

4. Aspectos Éticos

O projeto dessa tese foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCM-UNICAMP, segundo as determinações do Conselho Nacional de Saúde (Resoluções 196/96 e 251/97) e recebeu aprovação em 27 de outubro de 2009 (número de protocolo 894/2009). Todos os pacientes e controles envolvidos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido contendo os procedimentos da pesquisa; os desconfortos e riscos possíveis e benefícios esperados, a garantia do sigilo que assegure a privacidade quanto aos dados confidenciais, e a liberdade de abandonar a pesquisa em qualquer tempo sem ter sua assistência médica comprometida, o nome e telefone dos pesquisadores para esclarecer eventuais dúvidas, bem como o telefone do Comitê de Ética em Pesquisa.

5. Casuística Geral do Estudo

100 pacientes com LMC, independentemente da fase da doença e do tratamento, foram incluídos neste estudo, além de 20 doadores de sangue saudáveis. O diagnóstico de todos os pacientes foi feito por médicos do hemocentro, a partir dos achados clínicos e laboratoriais encontrados. No exame clínico foi verificada hepatomegalia, esplenomegalia, sudorese, palidez, perda de peso, sangramento dentre outros. Para a conclusão do diagnóstico foram realizados exames como o hemograma completo, exames de bioquímica, biópsia de medula óssea, citogenética, exames de biologia molecular para detecção do transcrito BCR-ABL e proteínas P190 e P210 além de imunofenotipagem.

Foi realizada a classificação do paciente de acordo com a fase da doença (fase crônica, acelerada ou crise blástica) a partir dos critérios propostos pelo *International Bone Marrow Transplant Registry* (IBMTR) (Rowlings, Horowitz et al. 1992) e pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Em relação à resposta ao tratamento todos os pacientes foram classificados de acordo com os critérios consensuais da *European Leukemia Net* (Li and Sethi 2010) como tendo resposta, falha ou resposta sub-ótima para inibidores da tirosina quinase.

Os pacientes foram tratados com imatinibe 300-800 mg / dia, dasatinibe 70-140 mg / dia ou nilotinibe 800 mg / dia. Dasatinibe e nilotinibe foram usados em pacientes com resistência ou intolerância ao imatinibe, exceto em quatro pacientes incluídos em ensaios clínicos de fase III. Esses pacientes receberam dasatinibe (1 paciente - 100 mg / dia), nilotinibe (2 pacientes - 800 mg / dia) ou bosutinibe (1 paciente - 500 mg / dia) como tratamento de primeira linha.

Todas as amostras foram coletadas no Hemocentro da Universidade Estadual de Campinas entre 2009 e 2012. As características clínicas dos pacientes estão resumidas na

Tabela I. A média de idade dos controles é 34 anos (intervalo: 26-57 anos). Ressalta-se que se optou por manter os pacientes que não estavam em fase crônica no estudo, mesmo

sendo uma parcela pequena dos pacientes e deixando a população um pouco heterogênea, porque todos estavam dentro dos critérios de inclusão.

Tabela I: Características dos pacientes que participaram do estudo

Dados relativos à data da avaliação da expressão gênica		
Características	n=100	(%) ou (intervalo)
Sexo (M/F/%)	61/39	(61%/39%)
Idade (media/intervalo) anos	50	(20-84)
Status da doença		
Fase Crônica	93	(93%)
Fase Acelerada	03	(3%)
Crise Blástica	04	(4%)
Tratamento		
Hydroxiuréia	04	(4%)
Imatinibe	66	(66%)
Dasatinibe	12	(12%)
Nilotinibe	18	(18%)
Resposta clínica ao ITK*		
Responsivos	68	(68%)
Resistentes	20	(20%)
Resposta sub-ótima	10	(10%)
NA**	02	(2%)
Média de tempo entre diagnóstico e início do tratamento com TKI (meses)	11	(0-95)
Idade ao diagnóstico (media/intervalo)	44	(05#-80)
Tratamentos prévios		
Sim (α -interferon/TMO***)	27/2	(27%/2%)
Não (exceto hydroxiuréia)	71	(71%)
Sokal ao diagnóstico		
Baixo	21	(21%)
Intermediário	29	(29%)
Alto	20	(20%)
NA	30	(30%)
Dados no último dia de tratamento ou última consulta realizada		
Status da doença		
Fase crônica	89	(89%)
Fase acelerada	05	(5%)
Crise blástica	02	(2%)
Óbito****	04	(4%)

*Inibidores de Tirosina Quinase ** Não Avaliáveis *** Transplante de Medula Óssea

****Progressão de Doença #Uma paciente foi diagnosticada quando tinha 5 anos de idade, essa paciente foi incluída nesse estudo quando estava com 39 anos.

CAPÍTULO I – CONSTRUÇÃO DAS BIBLIOTECAS SUBTRATIVAS SUPRESSIVAS E VALIDAÇÃO

Como mencionado anteriormente, a principal característica da LMC é a presença do cromossomo Ph; esse cromossomo origina uma doença clonal de células tronco com produção desregulada da proteína quinase BCR-ABL (Deininger, Goldman et al. 2000; Melo, Hughes et al. 2003; Baran and Saydam 2012; Luatti, Castagnetti et al. 2012). Esse processo ocorre devido à ativação de várias vias de transdução de sinais que levam ao aumento da proliferação celular, redução da adesão de células leucêmicas no estroma da medula óssea, a supressão da resposta apoptótica aos estímulos mutagênicos e bloqueio da diferenciação celular, resultando na carcinogênese (Inokuchi 2006; Luatti, Castagnetti et al. 2012; Park, Koh et al. 2013).

Inibidores específicos capazes de atuar em várias das vias de sinalização, que são alteradas devido à presença do BCR-ABL, têm sido desenvolvidos na tentativa de inibir esta proteína. No entanto, alguns pacientes são resistentes a estes inibidores e estes medicamentos não agem sobre todas as vias afetadas na CML.

A construção de bibliotecas gênicas, como o próprio nome diz, traz a possibilidade do encontro de inúmeros genes sem antes conhece-los, como livros expostos em estantes para serem estudados. E como em uma ferramenta de busca entre duas bibliotecas, fossem selecionados apenas os livros que existem em uma delas. Essa técnica possibilita a comparação entre duas populações distintas de RNA e a obtenção de clones de genes que estão expressos em apenas uma condição. Assim, os resultados das Bibliotecas Subtrativas Supressivas (*Suppression Subtractive Hybridization* - SSH) (Diatchenko, Lau et al. 1996; Diatchenko, Lukyanov et al. 1999; Rensing Rix, Rix et al. 2009) a partir da avaliação da expressão gênica diferencial, correlacionados com as alterações observadas em diferentes vias que, direta ou indiretamente, estão envolvidas na LMC podem proporcionar uma nova visão sobre a patogenia da doença.

Nesse estudo, bibliotecas SSH foram construídas para comparar transcritos obtidos a partir de RNA de granulócitos de pacientes com LMC e de indivíduos controles, a fim de analisar outros genes que podem estar envolvidos nessa doença. As expressões dos genes *TOBI*, *RUNX1*, *SEPT5*, *KPNA6*, *FLT3* e *MIER1*, entre outros, foram investigadas devido a

sua importância clínica potencial em diferentes tipos de câncer. Finalmente, as vias de sinalização alteradas pela doença foram correlacionadas com os genes encontrados, alguns deles identificados pela primeira vez em LMC.

Pacientes e Métodos

Pacientes

Dentre os 100 pacientes incluídos no estudo:

- Para a construção das bibliotecas foram utilizadas amostras, de granulócitos colhidos de sangue periférico, de dois pacientes com LMC ao diagnóstico em uso de hidroxiuréia por até dois dias e amostras de dois doadores de sangue saudáveis com idades próximas a dos pacientes.

- Para a validação dos genes o número de amostras utilizadas está descrito no gráfico correspondente a cada gene na Figura 20 e Figura 21.

Separação dos granulócitos a partir de sangue periférico

Os granulócitos foram separados do sangue periférico, de acordo com o método descrito por Canalli et al (Canalli, Costa et al. 2005). O sangue periférico coletado foi submetido a um sistema gradiente Ficoll-Hypaque de densidades 1,077 g/L e 1119 g/L, centrifugado à 700g por 30 minutos, temperatura ambiente. Os granulócitos e as células mononucleares foram separados e ressuspensos em PBS (pH 7,4) (Figura 4). Foi realizada a lise das células vermelhas utilizando tampão de lise e, em seguida, as células foram lavadas e ressuspensas em tampão PBS 1X. A contagem total das células foi feita em câmara de Neubauer e a contagem diferencial em lâminas preparadas em cito centrífuga e coradas em May-Grüwalds, nessa lamina é possível avaliar a população celular predominante na amostra separada, sendo observada então a maior parte da população celular composta por granulócitos. A viabilidade foi determinada pelo método de exclusão com o corante Azul de Trypan (0,1%).

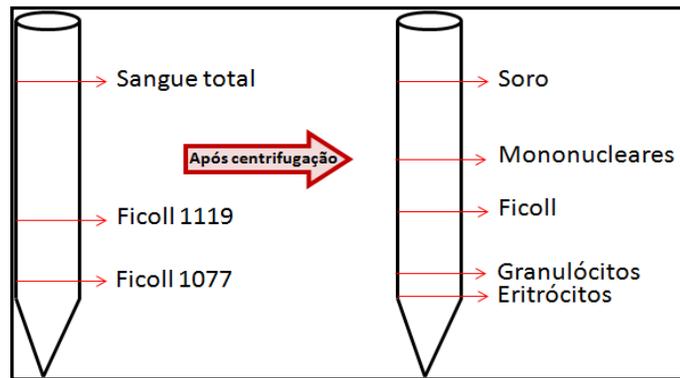


Figura 4: O sangue periférico foi submetido ao sistema de gradiente de Ficoll-Hypaque de densidade 1,077g/L e 1119g/L e centrifugado para que ocorresse a separação.

Análise da separação dos granulócitos por citometria de fluxo

O grau de contaminação das células separadas foi avaliado pela expressão de marcador de superfície celular utilizando um conjugado-FITC com o anticorpo monoclonal CD45 (Dako, Glostrup, Denmark) por 20 minutos, à temperatura ambiente, no escuro. Como controle negativo, foram usadas as células separadas ressuspensas em tampão PBS sem marcação com anticorpos. As células foram lavadas com PBS e caso a análise fosse ser realizada no dia seguinte ressuspensas em paraformaldeído 1%. A análise foi feita pelo citometro de fluxo FacScalibur (BD Biosciences, CA, EUA) e informações sobre 10.000 eventos foram obtidas para análise utilizando o software Cell Quest (Becton Dickinson)

A medida da expressão de marcador de superfície celular CD45 foi realizada para avaliação da contaminação com linfócitos, que são as células mais fortemente marcadas com esse marcador, e observação da população de granulócitos que tem intensidade de marcação menor. Quando feita a análise da citometria de fluxo foi levada em consideração, além da intensidade de marcação, a granulosidade da célula. Podendo assim os *gates* serem feitos selecionando cada uma das populações presentes na amostra (Figura 5).

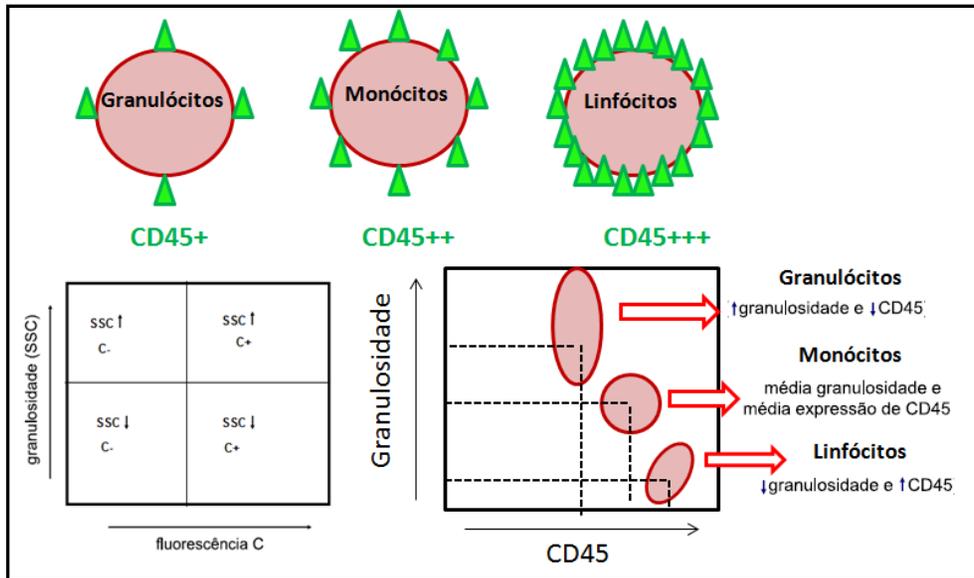


Figura 5: Esquema mostrando como foram selecionadas as populações de granulócitos por citometria de fluxo para verificação da contaminação com linfócitos.

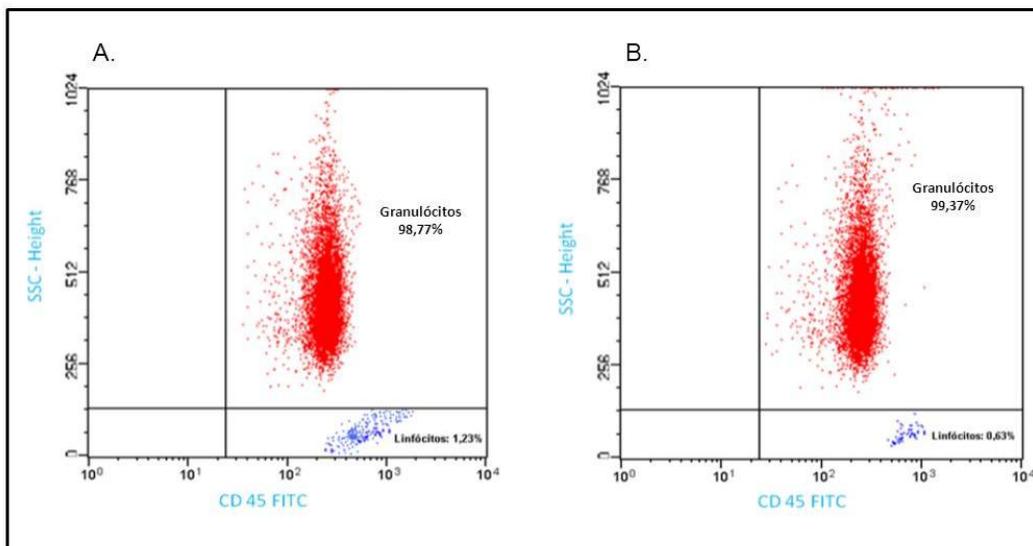


Figura 6: Análise de citometria de fluxo para certificação da pureza da amostra de granulócitos com marcador de superfície CD45 FITC. No quadrante A observa-se 98,77% de granulócitos e contaminação de 1,23% de linfócitos em uma amostra de controle sadio e no quadrante B 99,37% de granulócitos e contaminação com 0,63% de linfócitos em um paciente com LMC.

Biblioteca Subtrativa

As bibliotecas SSH foram construídas usando *PCR-Select cDNA Subtraction Kit* (Clontech Laboratories). Essa técnica possibilita a comparação entre duas populações distintas de RNA e a obtenção de clones que estão expressos em apenas uma condição. Essa técnica é composta por fases de hibridizações e ampliações além da clonagem e sequenciamento (Diatchenko, Lau et al. 1996) (Figura 7). No presente estudo, comparou-se transcritos obtidos a partir de RNA de granulócitos de pacientes com LMC e de indivíduos controles. Dois *pools* de RNA foram preparados, um contendo RNAs de duas amostras de controles e outro contendo RNAs de duas amostras de pacientes com LMC, ambos foram tratados com *DNaseI*.

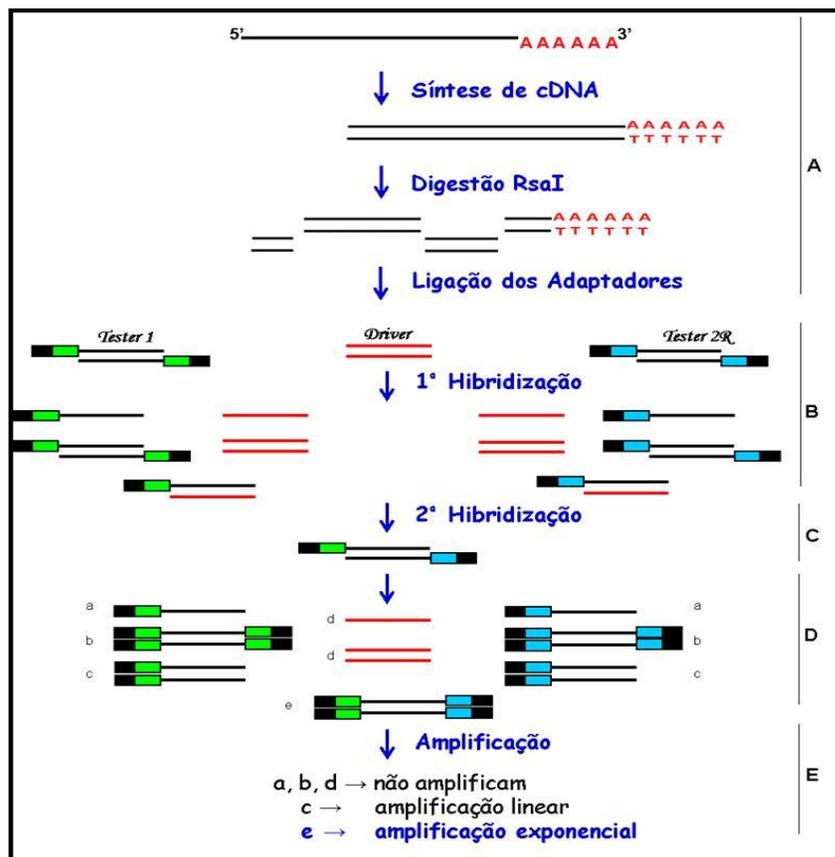


Figura 7: Esquema das etapas envolvidas na construção das Bibliotecas Subtrativas. (A) Síntese dos cDNAs, digestão com RsaI dos cDNAs e ligação dos adaptadores; (B) 1ª

hibridização; (C) 2ª hibridização; (D) 1ª amplificação dos transcritos; (E) 2ª amplificação dos transcritos.

Verificação da qualidade dos RNAs

Duas Bibliotecas Subtrativas foram construídas a partir de RNAs extraídos de granulócitos isolados do sangue periférico, tendo como objetivo a identificação de genes diferencialmente expressos em pacientes com LMC, em relação a indivíduos controles. A qualidade de alguns dos RNAs extraídos pode ser observada na Figura 8.

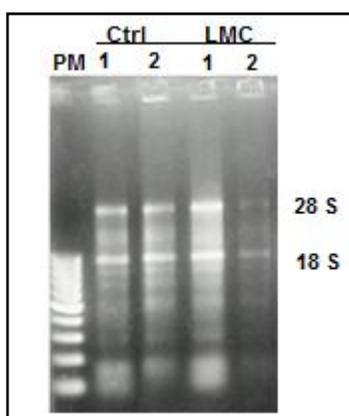


Figura 8: Qualidade dos RNAs. Os RNAs de granulócitos de indivíduos controles (CTRL) e de pacientes com LMC visualizadas em gel desnaturante. Observa-se as subunidades 28S e 18S. PM – peso molecular (100pb).

Síntese e amplificação de cDNAs

Para a construção das Bibliotecas, os cDNA de uma população foi denominado *tester* (população a ser testada) e da outra *driver*. Na biblioteca *forward* ou sense, o cDNA *tester* corresponde a amostra dos indivíduos controles e o cDNA *driver* dos pacientes com LMC. Na biblioteca *reverse* ou anti-sense, o cDNA *tester* corresponde a amostra dos pacientes com LMC e o cDNA *driver* a dos indivíduos controles. Assim, na biblioteca *forward* estão identificados os transcritos presentes apenas em granulócitos de controles e na *reverse* os transcritos presentes apenas nos pacientes com LMC.

Para a síntese do cDNA, 500ng do *pool* de RNA previamente tratado, 3'-BD *SMART CDS Primer II A* 2,4 μ M (5' – AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT₍₃₀₎VN – 3', sendo V = A, G ou C e N = qualquer base nitrogenada) e *SMART II A Oligonucleotide* 2,4 μ M (5' –AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG – 3') foram incubados a 70°C por 2 min. Em seguida, foram adicionados *First-Strand Syntesis Buffer 1x*, DTT 2mM, dNTP 1mM e 20U de *AMV PowerScript Reverse Transcriptase* (20U/ μ L), incubando por 1 hora a 42°C. O tampão Tris-EDTA foi então adicionado para volume final de 50 μ L.

A qualidade da síntese de cDNA foi verificada através da amplificação do gene β -*actina*, usando tampão de enzima 1x; MgCl₂ 2mM; dNTP 200 μ M; primer β -*actina Sense* 0,32 μ M; primer β -*actina Antisense* 0,32 μ M; 1U de enzima *Taq polimerase* 5U/ μ L (Invitrogen); e 50ng de cDNA. A programação usada foi: desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguida de amplificação através de 35 ciclos de 95°C por 1 min, 58°C por 1 min e 72°C por 2 min, com uma extensão final por 5 min a 72°C. A análise do produto de PCR foi feita por eletroforese em gel de agarose.

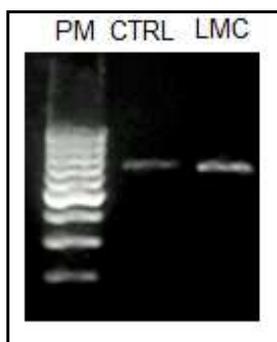


Figura 9: Análise da Síntese de cDNAs. Amplificação do gene β -actina nas amostras de cDNAs de indivíduos controles (CTRL) e pacientes com LMC. PM – peso molecular (100pb).

Para as etapas seguintes, foi realizada a padronização do número de ciclos para assegurar que o cDNA permaneceria em sua fase exponencial de amplificação. Um aumento no número de ciclos resulta em uma amostra pobre para a subtração, visto que na fase de platô o número de cópias dos genes se equivale. A otimização do número de ciclos da LD PCR usando tampão da enzima 1x; MgSO₄ 2mM; dNTP 200 μ M; 5' *PCR Primer* (5' - AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT - 3') 0,48 μ M; 2,5U de enzima *Platinum Taq HiFi*

5U/ μ L; cDNA diluído 1:10. A programação da LD PCR foi: desnaturação inicial de 1 min a 95°C, seguida de amplificação através de 35 ciclos de 95°C por 10 s, 60°C por 15 s e 68°C por 6 min. Foram retirados 5 μ L de amostra a cada 3 ciclos, a partir do ciclo 15, da LD PCR para análise da amplificação.

A análise do padrão mostrou que com o aumento do número de ciclos, ocorreu um aumento na intensidade das bandas até que esta intensidade permaneceu constante, mostrando que a amplificação chegou à sua fase de platô. A fase estável da amplificação foi atingida após 30 ciclos para a amostra CTRL e após 33 ciclos para a amostra LMC. Assim, o ciclo 29 e o ciclo 32 foram selecionados como sendo o ciclo ótimo da LD PCR para as amostras CTRL e LMC, respectivamente.

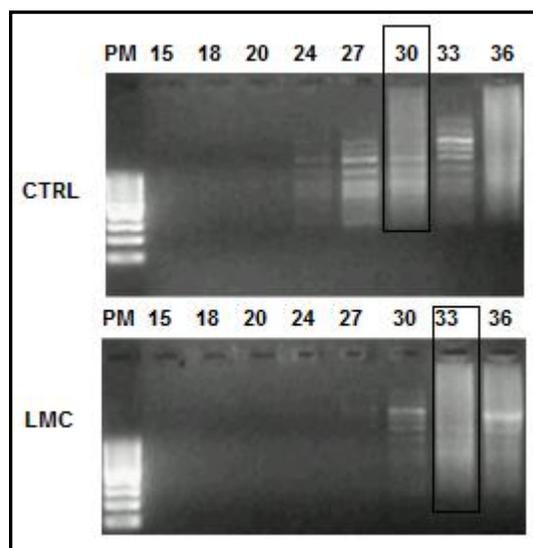


Figura 10: Padronização do número ótimo de ciclos da LD PCR. Os ciclos 29 e 32 foram selecionados como ciclo ótimo para as populações CTRL e LMC, respectivamente. PM – peso molecular 100pb; CTRL – amplificação da amostra referente ao cDNA do *pool* de RNAs dos controles; LMC – amplificação da amostra referente ao cDNA do *pool* de RNAs dos pacientes com LMC.

Digestão com *RsaI*

O produto da *Long Distance PCR* foi purificado usando *Wizard SV Gel and PCR Clean Up System* (Promega). O produto da *LD PCR* foi homogeneizado com solução *Membrane Binding Solution* e transferido para uma *SV Minicolumn* previamente tratada

com a mesma solução. Uma incubação por 1 min a temperatura ambiente foi feita, seguida de centrifugação por 2 min a temperatura ambiente. O eluato foi descartado e a solução *Membrane Wash Solution* foi adicionada à *SV Minicolumn* seguida de centrifugação por 2 min a temperatura ambiente. A *SV Minicolumn* foi transferida para um novo *eppendorf* e a eluição da LD PCR foi feita através da adição de água a 65°C, seguida de incubação por 1 min a temperatura ambiente e de centrifugação por 2 min.

Os cDNA *tester* e *driver* amplificados e purificados foram digeridos com a enzima *RsaI*. Para a digestão, ao volume de 96µL do produto de *LD PCR* purificado foram adicionados tampão *Tango* 1x e 30U da enzima *RsaI* 10U/µL, incubando-se *overnight* a 37°C. Após esse período, foi adicionado EDTA / Glicogênio para a inativação da enzima. A confirmação da digestão foi realizada através de uma eletroforese usando cDNA não digerido e cDNA digerido (Figura 11 A). Anteriormente à digestão, os cDNAs apresentam tamanho entre 0,5 e 10 kb, correspondentes aos mRNAs abundantes. Após a digestão, os transcritos têm tamanho menor, variando entre 0,1 e 2 kb. A Figura 11 B mostra o perfil observado após a purificação dos cDNAs digeridos. O produto da digestão foi purificado adicionando-se igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (Invitrogen) e centrifugado a 13.000 rpm por 5 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o DNA foi precipitado com glicogênio 0,5%, acetato de amônio 7,5 M e etanol absoluto, incubando em banho de gelo seco com etanol por 15 min e centrifugando a 13.000 rpm por 30 min e 4°C. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70%, centrifugado a 13.000 rpm por 10 min e 4°C, e ressuspensão em 150µL de água DEPC. A verificação da integridade do DNA purificado foi feita através de eletroforese.

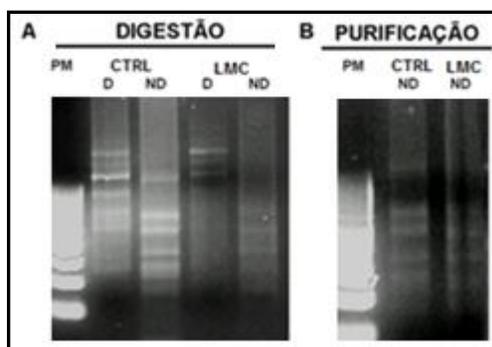


Figura 11: Digestão dos cDNAs com *RsaI* e purificação. (A) cDNA digerido. (B) cDNA purificado. PM – peso molecular (100 pb); CTRL D –controle digerido; CTRL ND –controle não digerido; LMC D –LMC digerido; LMC ND – LMC não digerido.

Ligação dos Adaptadores

Para a ligação dos adaptadores, o cDNA *tester* digerido e purificado foi diluído em água na proporção 1:5. Um volume de 2 μ L dessa amostra de cDNA *tester* purificada, digerida e diluída 1:5 foi ligado a 2 μ L de adaptador 1 10 μ M (adaptador 1: 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCGGGCAGGT-3') ou adaptador 2R 10 μ M (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3'), adicionando, a cada reação, 6 μ L de *Master Mix* (contendo 2 μ L de tampão *T₄ DNA ligase 5x*, 1 μ L de enzima *T₄ DNA ligase* e 3 μ L de água). Foram misturados 2 μ L da ligação com o adaptador 1 e 2 μ L da ligação com o adaptador 2R, reservando-os como *tester* não subtraído. As ligações foram incubadas *overnight* a 16°C. Após esse período, foi adicionado, em cada tubo, 1 μ L de EDTA / Glicogênio, e foi feita uma incubação a 72°C por 5 min para inativar a enzima *ligase*.

Hibridizações

Na primeira hibridização, fase na qual ocorre a primeira subtração, cada 1,5 μ L de cDNA *tester* (ligado ao adaptador 1 ou ao adaptador 2R) foi hibridizada separadamente com 1 μ L de tampão de hibridização 4x e 1,5 μ L de cDNA *driver* também digerido com *RsaI* e purificado. Foram feitas duas incubações: uma a 98°C por 1,5 min seguida por outra a 68°C por 8 horas. Desse modo, as sequencias que são expressas apenas na população

cDNA *tester*, correspondentes às moléculas diferencialmente expressas nessa população, estão na condição de fita simples e possuem adaptadores diferentes ligados às suas extremidades. As moléculas comuns às duas populações sofrem hibridização, com consequente formação de estruturas dupla fita. As moléculas específicas da população *driver* também estão na forma de fita simples, mas não possuem os adaptadores ligados às suas extremidades e, por isso, não são amplificadas por PCR nas etapas posteriores.

Na segunda hibridização, fase em que ocorre a supressão dos transcritos muito expressos e o enriquecimento dos transcritos menos abundantes, foram misturadas as alíquotas de cDNA *tester* da 1^o hibridização com 1µL de uma mistura, contendo 1µL de cDNA *driver* digerido com *RsaI* (previamente desnaturado a 98°C por 1,5 min), 1µL de tampão de hibridização 4x e 2µL de água. A mistura foi realizada da seguinte forma: com uma pipeta marcando 15µL foi pipetado o volume total do tubo contendo o adaptador 2R, puxando um pouco de ar na ponteira; em seguida foi pipetado o *driver* desnaturado a 98°C. Essas amostras foram transferidas para o tubo da 1^a hibridização contendo o adaptador 1, aquecido a 68°C, homogeneizando-se. Dessa forma, os conteúdos dos 3 tubos (cDNA *tester* ligado ao adaptador 1 após 1^a hibridização; cDNA *tester* ligado ao adaptador 2R após 1^a hibridização; e cDNA *driver*) foram misturados ao mesmo tempo. As reações foram incubadas *overnight* a 68°C. Após esse período, 200µL de tampão de diluição foram adicionados à amostra, incubando-se a 68°C por 7 min. Apenas as moléculas fita simples específicas ligam-se para a formação de estruturas em dupla fita.

Amplificação dos Transcritos

Nessas etapas apenas os fragmentos ligados aos adaptadores em ambas às extremidades são amplificados. Com isso, ocorre uma diminuição no “rastros” e na intensidade das bandas observadas no gel, indicando que os transcritos presentes em ambas às amostras foram subtraídos, remanescendo apenas os transcritos diferenciais.

A PCR (1^a amplificação) foi realizada usando tampão *Advantage 2 PCR Buffer* 1x; dNTP 1,25mM; 5' *PCR Primer 1* 0,20µM; enzima *50x Advantage cDNA polymerase mix* (Clontech); e cDNA. A programação utilizada foi: 5 min a 75°C (preenchimento das extremidades dos adaptadores na molécula de dupla fita); desnaturação inicial a 94°C por 25 s, seguida de amplificação através de 30 ciclos de 94°C por 10 s, 66°C por 30 s e 72°C

Clonagem, Amplificação e Sequenciamento

As amostras resultantes da *Nested PCR* foram clonadas em vetor *pGEM-T*. A reação de ligação dos produtos da *Nested PCR* ao plasmídeo *pGEM-T* foi realizada, seguida da transformação das bactérias através de eletroporação. As bactérias foram então plaqueadas em placas contendo meio LB / ampicilina / IPTG / X-Gal.

Para identificar as colônias com ou sem o inserto, foi usado um análogo sintético e não degradável da lactose, o isopropil- β -D-tio-galactosídeo (IPTG), que se associa ao repressor do gene *lacZ* (enzima β -galactosidase), inibindo-o e possibilitando que haja transcrição. A enzima β -galactosidase tem sua expressão induzida por IPTG, catalisando a conversão do substrato cromogênico X-Gal num precipitado de coloração azul. As colônias de bactérias que foram transformadas com plasmídeos sem o inserto apresentam o gene *lacZ* intacto e, na presença de IPTG e X-Gal, possuem coloração azul. Como o sítio de clonagem do *pGEM-T* interrompe o gene *lacZ*, as colônias de coloração branca correspondem às colônias contendo o plasmídeo com inserto, pois não expressam a enzima β -galactosidase.

As colônias positivas para inserto (coloração branca) foram selecionadas e inoculadas. A partir do inóculo, foram realizadas reações de PCR contendo iniciadores padrões M13, presentes no sítio de clonagem do plasmídeo. A figura abaixo mostra a amplificação por PCR de alguns inóculos positivos para o inserto, observando-se fragmentos com diferentes tamanhos. Em seguida, a PCR foi realizada utilizando os iniciadores M13 e sucessivamente estes produtos foram sequenciados no MegaBACE (Molecular Dynamics / Life Science, Reino Unido).

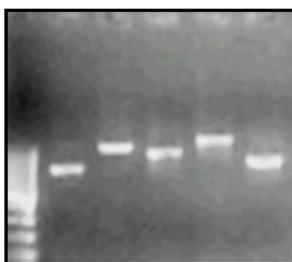


Figura 13: Amplificação de alguns dos inóculos positivos para o inserto de interesse após clonagem.

PCR em Tempo Real - qPCR

A validação dos resultados obtidos nas Bibliotecas Subtrativas foi realizada pelo método de PCR em Tempo Real, utilizando como molde da reação as mesmas amostras de cDNAs, sintetizadas a partir do pool de RNAs, usadas para a construção dessas Bibliotecas. E após a validação os testes foram feitos em um maior número de amostras de granulócitos.

O RNA dessas outras amostras foi extraído Rneasy Mini e Micro Kit (Qiagen GmbH, Hilden) segundo as instruções do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Life Sciences).

Foram escolhidos para a verificação por qPCR os genes que apareceram mais vezes quando as sequências obtidas foram analisadas. São eles: *SEPT5*, *RUNX1*, *KPNA6*, *FLT3*, *PAN3*, *TOB1*, *GP1BA*, *MIER1*, *SLC25A37* and *ITCH*.

Padronização do PCR em Tempo Real

A validação dos resultados obtidos nas Bibliotecas Subtrativas foi realizada pelo método de PCR em Tempo Real, utilizando como molde da reação as mesmas amostras de cDNAs, sintetizadas a partir do *pool* de RNAs, usadas para a construção dessas Bibliotecas.

Os genes mais representativos foram selecionados para essa validação. Os primers utilizados nas reações de PCR quantitativo em tempo real foram desenhados com o uso do software *Primer Express* (Applied Biosystems). Os fragmentos desenhados foram submetidos ao programa Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para confirmar homologia com o gene de interesse. A formação de estruturas como *hairpins* e *dimers* também foram avaliadas através do programa *Gene Runner*.

Em PCR quantitativo em tempo real (qPCR), a concentração ideal de primer a ser utilizada deve ser a mínima suficiente para permitir a duplicação de todas as cópias do material a cada ciclo de reação. Para isso, utilizando a mesma quantidade de amostra, foram feitas reações contendo cada um dos primers (sense e anti-sense) nas concentrações finais de 150 nM, 300 nM, 600 nM e 900 nM. A concentração ideal foi aquela em que o gene de interesse obteve o menor valor de Ct (ciclo threshold), ou seja, foi a concentração em que o gene foi amplificado mais precocemente. Na

Tabela II estão listadas as concentrações dos primers utilizados na amplificação dos genes de estudo e a eficiência de amplificação obtida.

Tabela II: Sequência de cada par de primers e concentração ótima utilizada para a amplificação de alguns genes diferencialmente expressos encontrados nas Bibliotecas Subtrativas.

Gene	Primers	Concentration	Efic.%
<i>SEPT5</i>	Forward: 5'-CTGCTGCCTATACTTCATCTCCC -3' Reverse: 5'-ACGATGTTGACCTTCTCATGCA -3'	150 nM	99,4%
<i>TOB1</i>	Forward: 5'-GTGACAGCCCCCTTAACCTC -3' Reverse: 5'-CTCCATAGGCTGCAAACACAT -3'	150 nM	100%
<i>PAN3</i>	Forward: 5'-ACCCTAATGCTGATGCCTACTTC -3' Reverse: 5'-ATGCAGAACTTAGTTGGACAATATAG3'	300 nM	99,8%
<i>KPNA6</i>	Forward: 5'-GACGATGACACGGAATGCAGT -3' Reverse: 5'-GCGAGACAGTACAGGCAAACAA -3'	600 nM	99,9%
<i>GP1BA</i>	Forward: 5'-TCTAGTGGCAGGAAGGAGGC -3' Reverse: 5'-AGTACCTAATGCTCACTGTGCTCA -3'	300 nM	100%
<i>RUNX1</i>	Forward: 5'-GATGGCACTCTGGTCACTGT -3' Reverse: 5'-CTTTCCCTCTTCCACTTCG -3'	70 nM	99,8%
<i>MIER1</i>	Forward: 5'-TCAGGGTCCCACAGGAGC -3' Reverse: 5'-GGGCTCCATGTTTCAAGCA -3'	150 nM	100%
<i>CDC42</i>	Forward: 5'-GCAGTCACAGTTATGATTGGTGG 3' Reverse: 5'-GTCGTAATCTGTCAATAATCCTCTTGC3'	150 nM	99,9%
<i>FLT3</i>	Forward: 5'-GCTGGGCTTTTGACTION -3' Reverse: 5'-GTTTTGGTAGGTGTGAGGAC -3'	150 Nm	100%
<i>ITCH</i>	Forward: 5'-GCCGATTGCCAGTAGGAGG -3' Reverse: 5'-GGTCCAGGCGATTAACAGG -3'	150 Nm	99,6%
<i>SLC25A37</i>	Forward: 5'-CTCCACGATGCGGTAATGAA -3' Reverse: 5'-CGGTGCTGCGAGTTGTACAT -3'	150 Nm	100%

As reações para a determinação da concentração ótima de *primer* a ser utilizada e da eficiência de reação foram então realizadas. Na figura a seguir podem ser observadas algumas dbas curvas de eficiência para cada gene.

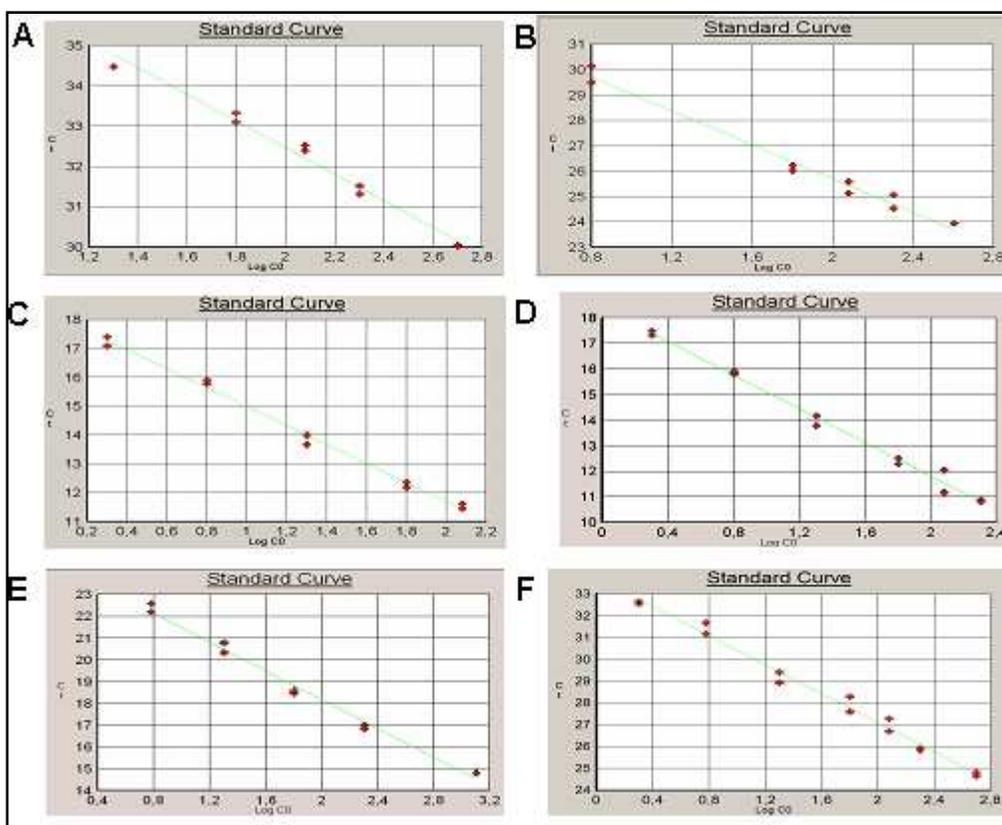


Figura 14: Eficiência de amplificação de alguns dos primers *GAPDH* (A), β -*ACTINA* (B), *TOBI* (C), *GPIBA* (D), *PAN3* (C), *SEPT5* (D).

Análises Estatísticas

A análise estatística foi realizada utilizando 5 *GraphPad Prism* (GraphPad Software, Inc., CA, EUA). O teste *t-Student* foi utilizado para análise dos resultados de qPCR e comparações. Diferenças significativas entre as médias foram determinadas pelo teste de Mann-Whitney. Significância foi considerada para valores $P \leq 0,05$.

Resultados

Perfil da expressão dos genes em granulócitos de pacientes com LMC e controles saudios

Um banco de dados de bioinformática para a apresentação de sequências geradas foi criado pelo Grupo de Bioinformática do Laboratório de Genômica e Expressão no Instituto

de Biologia da UNICAMP. As sequências foram analisadas por este banco de dados usando o programa PHRED (Ewing, Hillier et al. 1998)

Vetores ribossomais, adaptadores, as sequências de baixa qualidade e regiões poli-A foram excluídas e apenas sequências de alta qualidade [pelo menos 200 pares de base (pb), com valores PHRED maior que 20] foram analisadas. As bibliotecas foram comparadas e um total de 173 genes foram encontrados expressos na Biblioteca de controles, enquanto que 39 genes foram superexpressos na Biblioteca LMC (esses resultados estão disponíveis em: <http://www.lge.ibi.unicamp.br/reticulocito/>). Após a análise no BLAST (BLASTN- nucleotídeos e BLASTX- proteínas), as sequências sem similaridade foram classificadas como *no hits* e as sequências conhecidas foram usadas para explorar as vias metabólicas em que os genes diferencialmente expressos foram envolvidos.

Tabela III: Identificação de alguns genes encontrados nas SSHs. Os reads totais se referem ao número de vezes que o gene foi identificado, sendo descrito o número de vezes encontrado em cada uma das bibliotecas (reads CTRL ou reads LMC).

Grupo	mRNA	Total Reads	CTRL Reads	LMC Reads
201	<u>Homo sapiens clone 18 satellite III mRNA sequence</u>	05	0	05
208	<u>Homo sapiens genomic DNA, chromosome 21q22.1, segment 28/28, complete ...</u>	28	0	28
204	<u>Homo sapiens clone 17 satellite III mRNA sequence</u>	12	0	12
200	<u>Homo sapiens clone cos 9.27.3/1.2 satellite 3 repetitive DNA</u>	04	0	04
199	<u>Human satellite III DNA simple sequence 3 HinfI fragment (100)</u>	04	0	04
197	<u>Pan troglodytes chromosome 22 clone:PTB-125M11, map 22, complete seque...</u>	04	0	04
191	<u>PREDICTED: Pan troglodytes similar to Tob (TOB1), Mrna</u>	03	03	0
172	<u>Homo sapiens karyopherin alpha 6 (importin alpha 7) (KPNA6), mRNA</u>	02	02	0
178	<u>PREDICTED: Pan troglodytes male germ cell-associated kinase, transcrip...</u>	02	02	0
144	<u>Homo sapiens mRNA for H5 variant protein</u>	01	0	01
72	<u>PREDICTED: Pan troglodytes similar to sorting nexin associated golgi p...</u>	01	01	0

A caracterização da relação funcional entre os genes foi feita utilizando o programa *Ingenuity Pathway®* (Ingenuity Systems, www.ingenuity.com). Cada gene foi ligado ao seu gene correspondente usando a base Ingenuity Pathway Knowledge, que combina genes de acordo com seu GI (*gene identification*) (Ghosh, Zang et al. 2011). Na biblioteca de granulócitos de indivíduos controle, as principais vias relacionadas com os genes expressos foram: 1) as de sinalização, crescimento e proliferação celular; 2) movimento celular; 3) desenvolvimento e morfologia celular; 4) interação celular, desenvolvimento e funções do sistema hematológico; 5) desenvolvimento embrionário e de tecidos, estrutura e organização celular. Já na biblioteca de granulócitos de pacientes com LMC: 1)

desenvolvimento tecidual e celular; 2) sinalização celular e metabolismo de ácidos nucleicos.

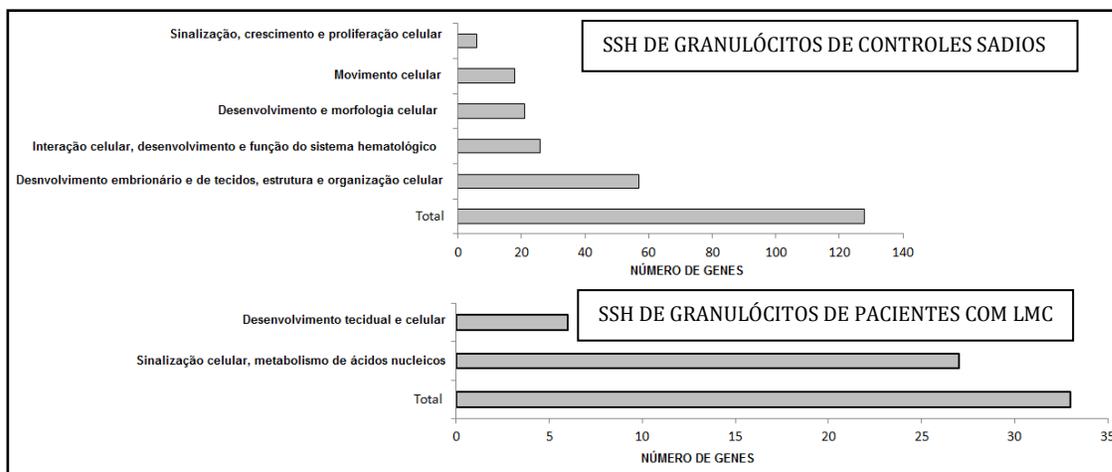


Figura 15: Categorização dos genes diferencialmente expressos. Genes diferencialmente expressos entre as bibliotecas de controles e LMC de acordo com as vias de sinalização obtidas pela análise de bioinformática utilizando o programa Ingenuity®.

Além de genes diferencialmente expressos nas diferentes vias, houve correlações com outros genes que não foram encontrados nas bibliotecas, mas que podem estar envolvidos na regulação das vias ou talvez possam ser regulados por esses genes. Na biblioteca de controles, a maior parte dos genes diferencialmente expressos identificados estão envolvidas em vias de sinalização que são estritamente relacionadas com a regulação de células, tais como o NF-kB e AKT (Figura 16). Ou envolvidos na proliferação de células B, tais como a interleucina (IL) 4.

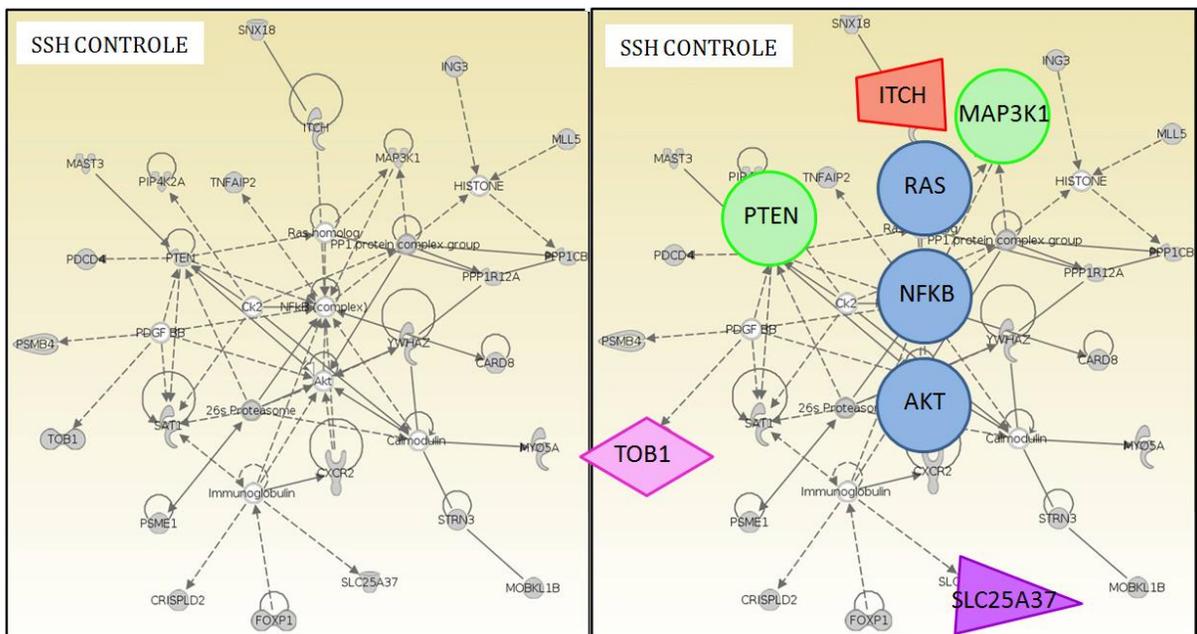


Figura 16: Exemplo de vias metabólicas encontradas na biblioteca controle, analisando com o Ingenuity Pathway Software. Observa-se uma relação funcional entre os genes diferencialmente expressos (cinza) e outros genes (branco) que não foram encontrados nas bibliotecas deste estudo, mas que regulam genes que foram encontrados.

Ao submeter às sequências encontradas nas bibliotecas ao *software* para que fossem formadas as *networks* foi possível perceber que, a regulação da via de NF- κ B também foi encontrada na biblioteca de LMC. Porém, essa via foi formada por genes diferentes dos genes que regulam na biblioteca de controles, sugerindo um mecanismo de regulação diferente. Outra correlação feita entre os genes diferencialmente expressos encontrados na LMC é a elevada produção de RNA polimerase II. Isso indica que as células na LMC têm uma produção aumentada dessa proteína, a qual tem um papel na codificação da maioria dos genes em eucariotos por sintetizar o mRNA citoplasmático (Hahn 2004), possibilitando que o material genético das células leucêmicas esteja em franca reprodução.

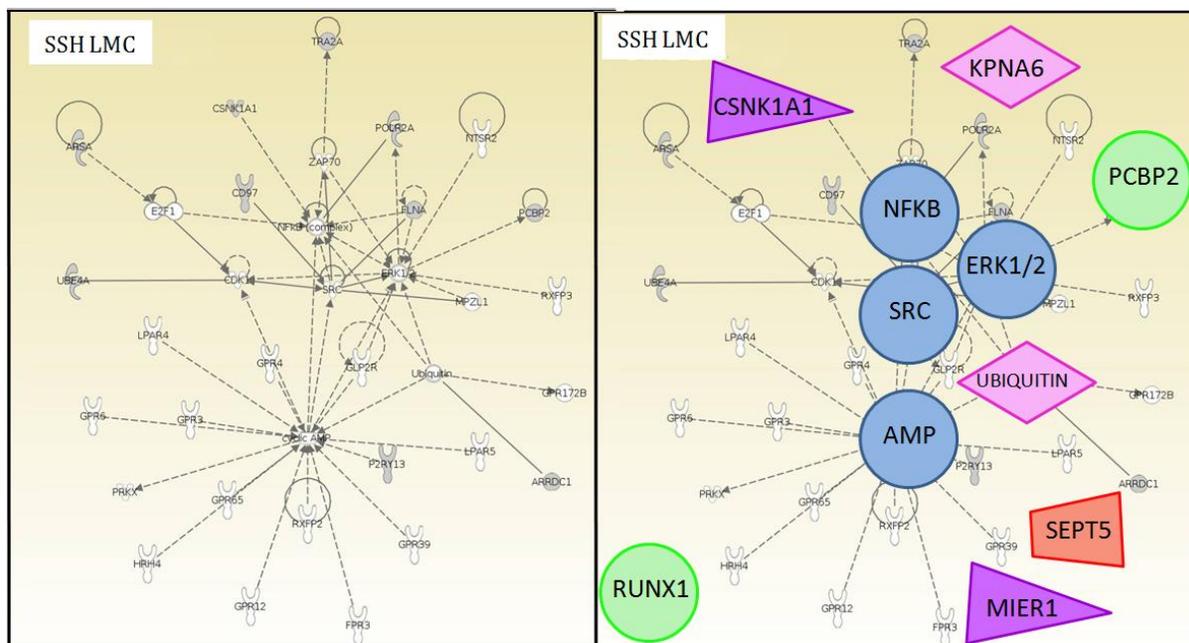


Figura 17: Exemplo de vias metabólicas encontradas na biblioteca de LMC, analisando com o Ingenuity Pathway Software. Observa-se uma relação funcional entre os genes diferencialmente expressos (cinza) e outros genes (branco) que não foram encontrados nas bibliotecas deste estudo, mas que regulam genes que foram encontrados.

Identificação e associação de genes em LMC

A fim de validar os resultados obtidos nas Bibliotecas Subtrativas foi feita a qPCR usando os mesmos *pools* de granulócitos usados para a construção das bibliotecas de *SSH*. Os seguintes genes foram escolhidos para a validação: genes encontrados na *SSH* de controles: *TOB1*, *PAN3*, *ITCH*, *FLT3*, *MIER* e *SLC25A37*; genes encontrados na *SSH* de LMC: *RUNX1*, *GP1BA*, *SEPT5*, e *KPNA6*. Esses genes foram encontrados em apenas uma das duas populações e foram escolhidos de acordo com o maior numero de vezes que apareceram nas bibliotecas. Utilizando essa análise, observou-se uma correlação de 80% entre o resultado da *SSH* e o encontrado pela técnica de qPCR, nessa etapa foram utilizadas para a realização dessa técnica as mesmas amostras que usadas na construção das bibliotecas, sendo que oito dos dez genes avaliados foram validados (Figura 18 e Figura 19).

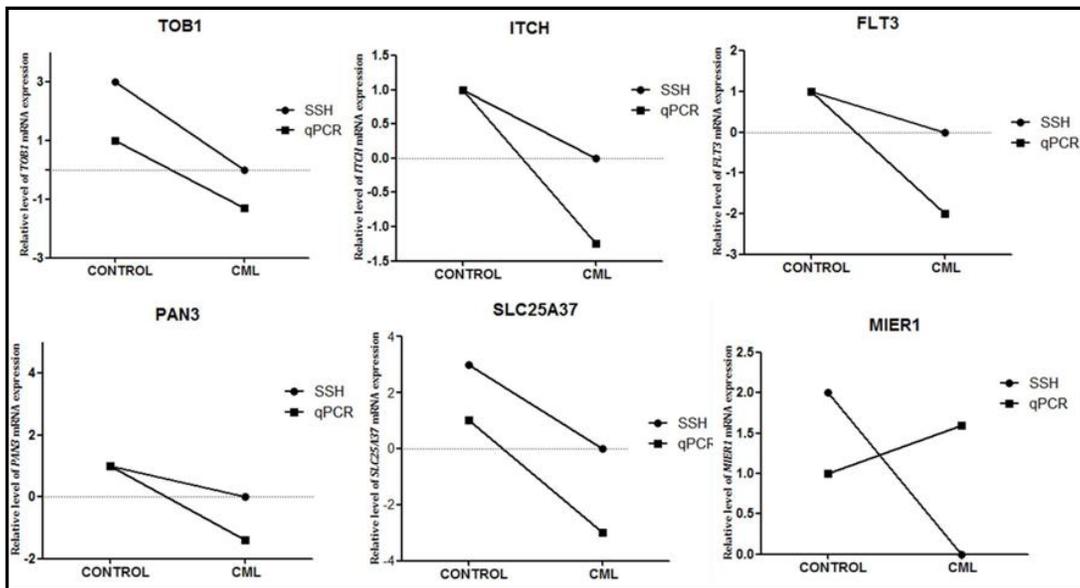


Figura 18: Validação da biblioteca de granulócitos de controles por qPCR, foram utilizadas as mesmas amostras nas duas técnicas. Expressão gênica calculada por $2^{-\Delta\Delta C_t}$. β -ACTINA e GAPDH utilizados para a normalização. *MIER1* não foi validado.

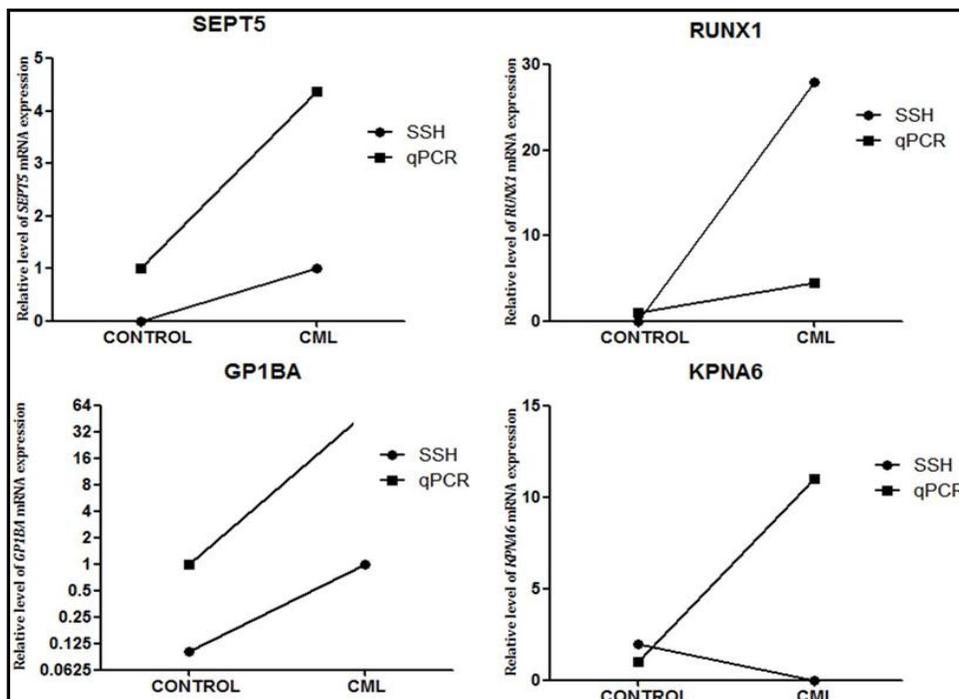


Figura 19: Validação da biblioteca de granulócitos de pacientes com LMC por qPCR, foram utilizadas as mesmas amostras nas duas técnicas. Expressão gênica calculada usando $2^{-\Delta\Delta C_t}$. β -ACTINA e GAPDH foram utilizados para a normalização. *KPNA6* não foi validado.

Para verificar o envolvimento desses genes no desenvolvimento ou progressão da LMC, o estudo foi ampliado para testar outras amostras de granulócitos de pacientes com LMC e doadores saudáveis. Os genes *SEPT5*, *RUNX1*, *FLT3*, *PAN3*, *TOBI* e *ITCH* foram escolhidos para esta análise com base nas grandes diferenças na expressão na comparação entre as duas bibliotecas. Já os genes *MIER1* e *KPNA6* foram escolhidos porque não foram validados nas amostras utilizadas para a construção das bibliotecas, então foi feita a avaliação com o intuito de verificar se foi um erro na análise do qPCR ou artefato da técnica de *SSH*. A Figura 20 e Figura 21 mostram os níveis relativos da expressão desses genes após a normalização, utilizando β -actina e GAPDH como genes endógenos.

A análise estatística mostra que as expressões dos genes *SEPT5*, *RUNX1* e *FLT3* foram significativamente maiores em indivíduos com LMC, enquanto as expressões de *PAN3*, *TOBI* e *ITCH* foram significativamente menores LMC em comparação aos controles. Comparando os resultados encontrados nas *SSH*'s com os resultados encontrados utilizando qPCR em amostras de granulócitos de vários pacientes com LMC e controles sadios observou-se que 75% dos resultados são iguais nas duas técnicas (de oito genes seis foram validados). Apesar da expressão de *MIER1* estar aumentada em pacientes com LMC e ter valor de p significativo, esse resultado não foi validado porque tal gene foi encontrado na biblioteca de controles. Já o gene *KPNA6* não foi validado porque, embora encontrado na biblioteca de controles, ao utilizar as mesmas amostras usadas para a construção das *SSH* para a quantificação por real time, o resultado foi controverso. Quando foram utilizadas as 12 amostras de pacientes e 10 amostras de controles o resultado foi igual ao encontrado na *SSH*, porém não significativo.

Entre esses genes, o *TOBI* pareceu ser promissor, uma vez que é um gene supressor tumoral que pode estar envolvido na proliferação de células leucêmicas, e que interage com vários outros genes encontrados neste estudo, portanto teve sua expressão estimada em um número maior de pacientes.

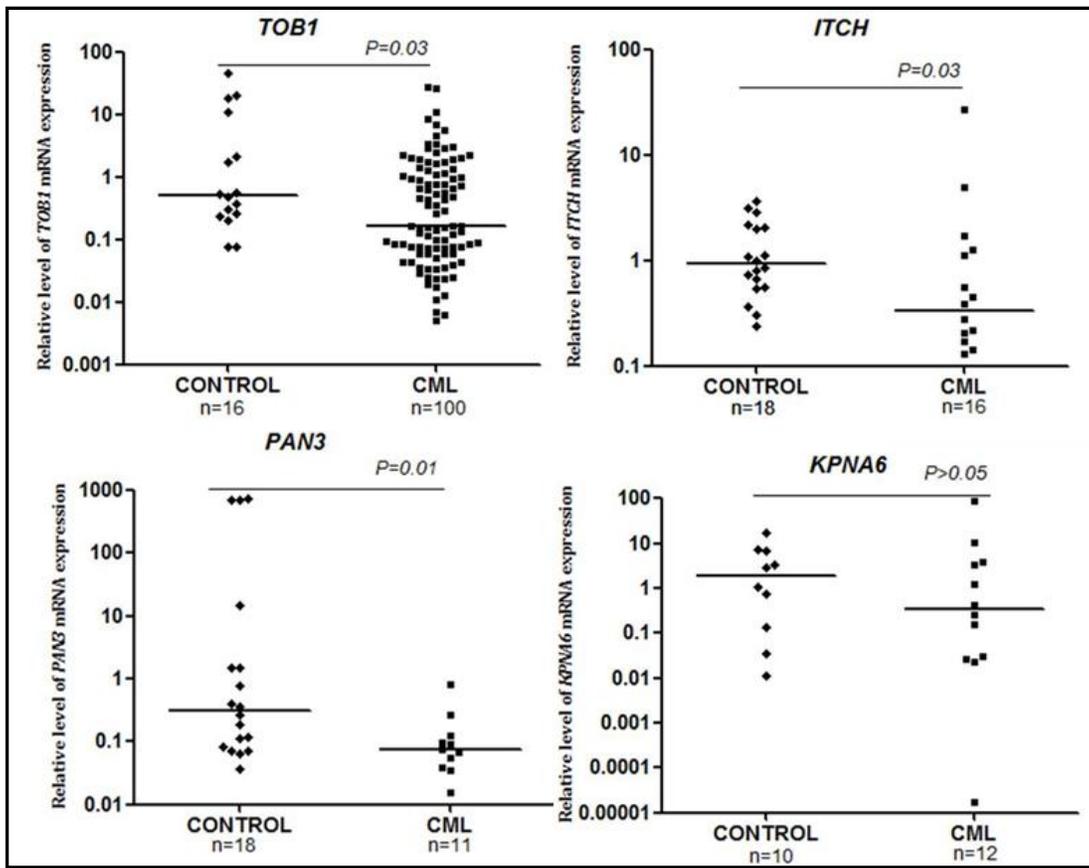


Figura 20: Análise da expressão gênica em granulócitos de indivíduos controles comparada a de pacientes com LMC a partir do qPCR usando os controles endógenos β -Actina e GAPDH. A mediana é identificada por uma linha na figura. Utilizado teste de Mann-Whitney, valor de $P \leq 0,05$ significativo. *KPNA6* não teve valor significativo.

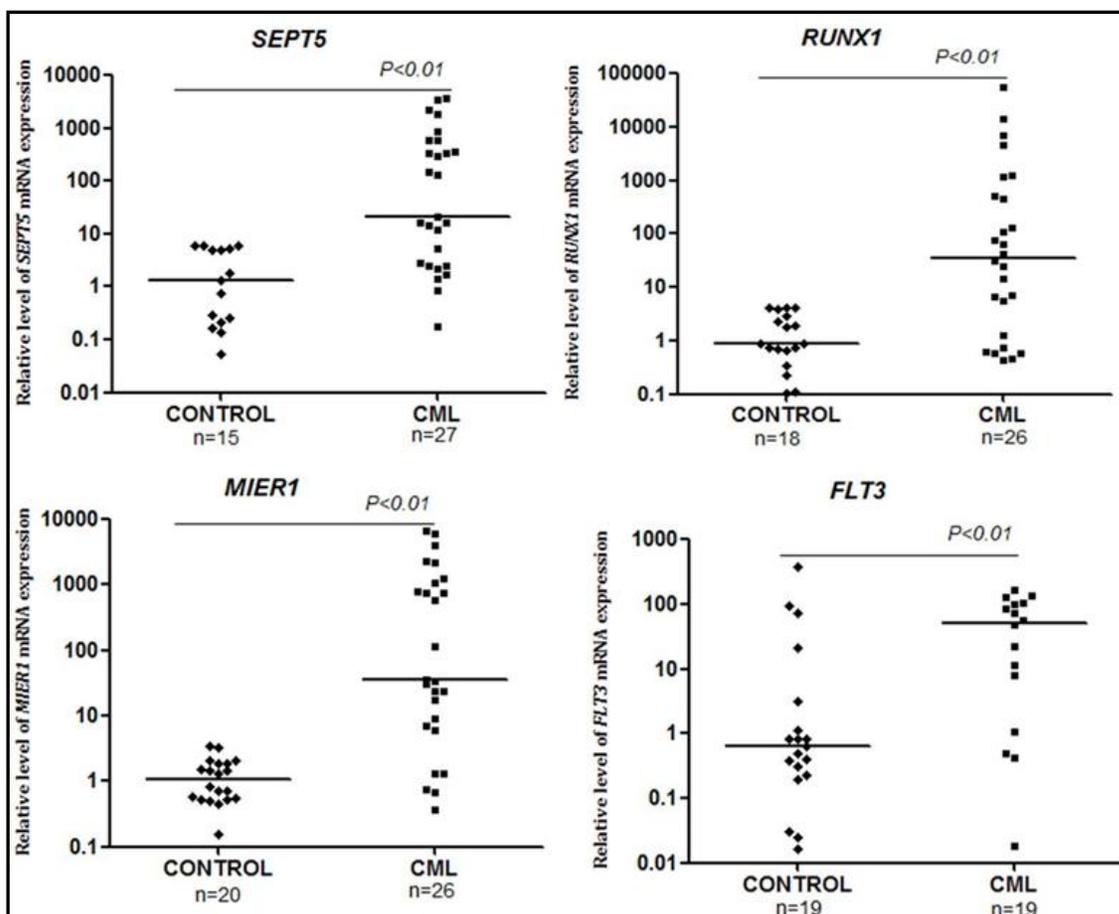


Figura 21: Expressão gênica de granulócitos de indivíduos controles comparada a de pacientes com LMC a partir do qPCR usando os controles endógenos β -Actina e GAPDH. A mediana é identificada por uma linha na figura. Utilizado teste de Mann-Whitney, valor de $P \leq 0,05$ significativo. *MIER1* apesar de ter valor de p significativo não foi validado de acordo com o resultado encontrado na *SSH*

Assim, devido à grande heterogeneidade de funções relacionadas com a expressão do gene *TOBI*, o número de vezes que ele apareceu nas análises e a inexistência de uma relação esclarecida entre esse gene e a LMC, neste estudo foi investigada a relação entre a expressão de mRNA e as diferentes respostas aos ITK's na LMC. Esse gene foi avaliado em doentes com resposta citogenética completa (CCgR), resposta citogenética parcial (PCgR), resposta citogenética menor (MINCgR) e sem resposta citogenética (NoCgR) após tratamento com TKI's e os resultados foram comparados com a expressão em granulócitos de indivíduos controle. Os resultados obtidos mostram que os pacientes NOCgR têm uma expressão de *TOBI* significativamente inferior a de doadores saudáveis e pacientes que

alcançaram CCgR (Figura 22). Pode ser observado que, ao confrontar controles e doentes em fase crônica usando imatinibe a expressão também é significativamente diferente, portanto independente do paciente estar em fase crônica a expressão do *TOB1*, ainda assim, continua menor do que em indivíduos sadios (Figura 23). Em contrapartida, os pacientes que respondem ao tratamento possuem um nível de expressão notadamente mais elevada do que os pacientes resistentes ao tratamento com TKI. Desse modo parece haver uma relação direta entre a LMC e a expressão de tal gene, conseqüentemente a expressão diminuída parece dificultar ou até impedir o alcance da resposta ao tratamento (Figura 24).

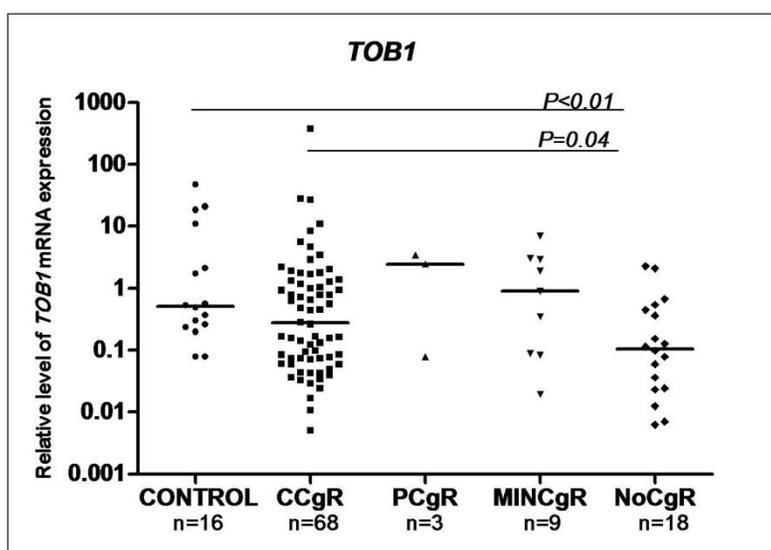


Figura 22: Expressão do gene *TOB1* em granulócitos de pacientes com LMC e controles. Os pacientes foram estudados de acordo com a resposta citogenética completa (CCgR), resposta citogenética parcial (PCgR); resposta citogenética menor (MINCgR) e sem resposta citogenética (NoCgR). β -Actina e GAPDH foram utilizados para a normalização. A mediana é identificada por uma linha horizontal na figura. Teste de Mann-Whitney ($P \leq 0,05$). Dois pacientes não foram inseridos nessa análise devido ao tempo de início do tratamento.

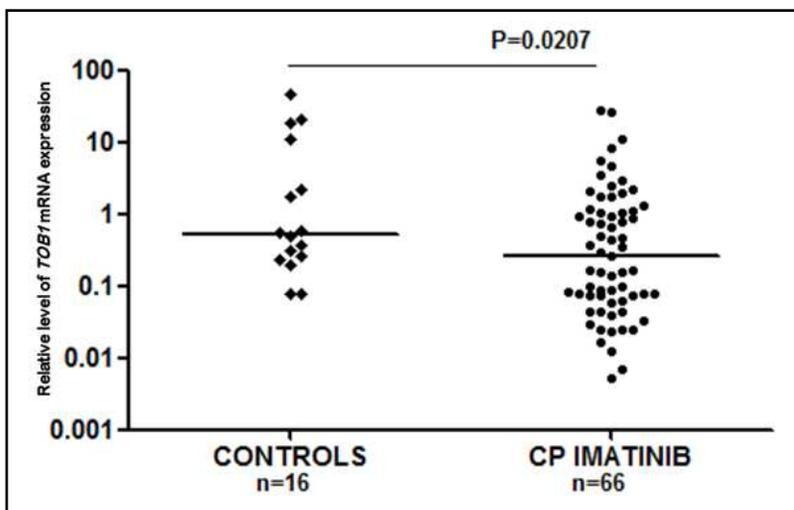


Figura 23: Comparação do nível de *TOB1* em granulócitos de controles saudáveis e de pacientes com LMC em fase crônica em uso de imatinibe. β -Actina e GAPDH foram utilizados para a normalização. Dois dos pacientes com resposta citogenética completa não estavam em uso de imatinibe. A mediana é identificada por uma linha horizontal na figura. Teste de Mann-Whitney, $P \leq 0.05$ significativo.

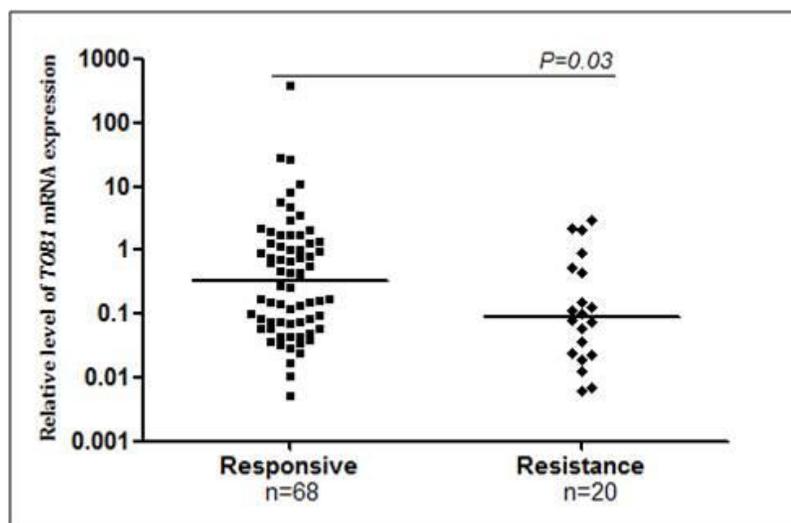


Figura 24: Investigação da expressão de *TOB1* em pacientes responsivos e resistentes a ITK's. β -Actina e GAPDH foram utilizados para a normalização. A mediana é identificada por uma linha horizontal na figura. Teste Mann-Whitney, $P \leq 0.05$ significativo.

Discussão

A técnica de SSH foi usada para identificar conjuntos específicos de genes cuja expressão tem sido associada com a fase crônica de LMC e que pode contribuir para uma melhor compreensão da doença.

A análise desenvolvida neste estudo mostra o potencial de identificação de genes-alvo, comparando genes expressos nos granulócitos de pacientes com LMC e doadores normais. Um total de 39 genes foi encontrado estando superexpressos e 173 com expressão diminuída em células de LMC. Quando esses genes foram utilizados para identificar vias metabólicas que podem estar reguladas positiva (expressão aumentada) ou negativamente (expressão diminuída) nessa doença, verificou-se que a maioria dos genes estavam relacionados com a regulação de NF-kB, AKT, o Interferon e a IL-4 em células de controle.

NF-kB é um fator de transcrição que se encontra em diferentes tipos de células e está envolvida em respostas celulares a estímulos tais como o stress, citocinas, radicais livres, radiação ultravioleta, e de antígenos virais e bacterianos (Albensi and Mattson 2000). Essa via é ativada em resposta a vários agentes inflamatórios, substâncias cancerígenas, promotores de tumor e fatores de crescimento (Albensi and Mattson 2000). Com importância fundamental na regulação da resposta imune, as mudanças que ocorrem na regulação de NF-kB estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento de câncer ou outras doenças inflamatórias e auto-imunes (Pezzolesi, Zbuk et al. 2007).

A proteína de NF-kB é constantemente ativada por vias alternativas em células cancerosas, que provavelmente causam resistência à apoptose e à formação de tumores devido a um aumento da expressão de RelA, a subunidade ativa de NF-kB em células BCR-ABL (Bidere, Ngo et al. 2009). Assim, a regulação alterada desse fator de transcrição *NF-KB* pode desempenhar um papel central no desenvolvimento de LMC (Stein and Baldwin 2011). Interessantemente, no presente estudo a via metabólica de NF-kB também foi encontrada em células de LMC, no entanto, a regulação nessa população foi realizada por genes diferentes daqueles encontrados nas células dos indivíduos controle.

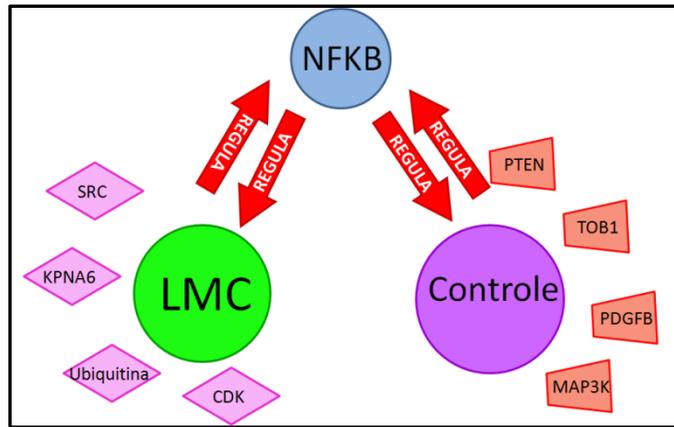


Figura 25: O gene NFKB tem sua regulação alterada em indivíduos com LMC.

Como visto na *network* da SSH de controles, o gene PTEN-6 é um dos genes regulados positivamente nas células de indivíduos controle. Esse gene codifica um supressor de tumor de fosfatase dupla especificidade, que regula negativamente a via da *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), que regula o crescimento e sobrevivência celular (Cerveira, Bizarro et al. 2011). Por outro lado, em granulócitos de LMC essa via parece ser regulada positivamente, principalmente pelo aumento da expressão de caseína-quinase 1 alfa (CSNK1), um gene que controla de forma positiva a expressão de NF-kB e que está envolvida na proliferação de células de tumor (Zhao, Wang et al. 2012).

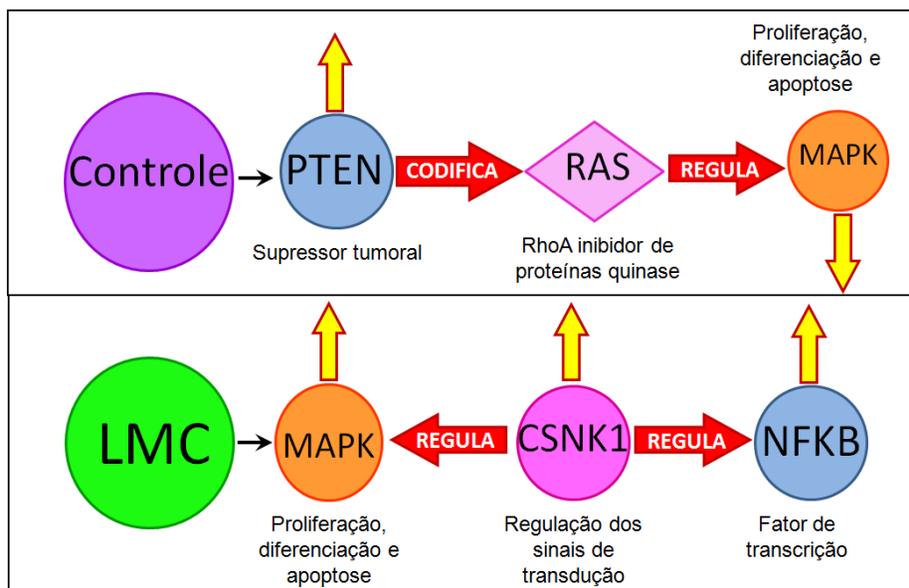


Figura 26: Esquema mostrando como ocorre a regulação de importantes genes em controles e LMC.

Deste modo essa via metabólica parece ser regulada diferencialmente em granulócitos normais e de LMC, indicando que os genes envolvidos na ativação desta via pode ser uma nova classe de potenciais alvos terapêuticos. Tomados em conjunto, os nossos resultados indicam que essas vias podem ter um papel na LMC, juntamente com o gene BCR-ABL, contribuindo para o controle da proliferação de células e a desregulação da via em LMC. Entre os genes superexpressos encontrados na LMC, observamos o *SEPT5*, *RUNX1*, *MIER1*, *KPNA6* e *FLT3*, enquanto *PAN3*, *TOB1* e *ITCH* estavam com expressão diminuída nessa doença em comparação com indivíduos controle.

O *SEPT5* é responsável pela produção de uma proteína cuja translocação, em conjunto com o gene *MLL*, têm sido relatada em pacientes com leucemia mielóide aguda e outras neoplasias hematológicas (Ichikawa, Asai et al. 2004). Recentemente esse gene foi indicado como um candidato a biomarcador por promover a metilação em tumor renal (Henrique, Luis et al. 2012). *RUNX1* é uma proteína responsável pelo controle de angiogênese e hematopoese, mutações do gene *RUNX1* têm sido descritas em muitos tipos de leucemia humana (Kohler, Speck et al. 1999; Blackmore, Mercer et al. 2008).

Já o gene *MIER1* atua como um fator de crescimento induzido e, dependendo do contexto celular, esse gene pode funcionar tanto como um ativador como um repressor de transcrição gênica (Murati, Brecqueville et al. 2012). *KPNA6* é um membro da família alfa importina responsável pela importação de fatores de transcrição importantes, tais como a *STAT3*, que é uma proteína ativada através da fosforilação em resposta a diversas citocinas e fatores de crescimento incluindo *EGF*, *IFN*, *IL-5*, *IL-6*, *HGF*, *BMP2* e *LIF* (Daver, Strati et al. 2013). A elevada expressão desse gene em células de LMC poderia estar relacionada com a importação contínua de fatores de transcrição e consequente ativação de transcrição de genes envolvidos na proliferação de células.

Outro gene encontrado com uma elevada expressão em células de LMC foi o *FLT3*. O gene codifica receptores de tirosina quinase classe III, que regulam a hematopoiese. Após a ativação desses receptores ocorre a fosforilação e ativação de vários efetores citoplasmáticos envolvidos na apoptose, proliferação e diferenciação de células hematopoiéticas na medula óssea. A ativação constitutiva dessa proteína, isto é, independente da ligação com outros genes ou proteínas, tem sido associada com o

desenvolvimento de muitas doenças malignas mielóides (Tzachanis, Freeman et al. 2001; Bai, Yang et al. 2004). No presente estudo, a expressão desse gene foi significativamente maior em granulócitos de LMC, sugerindo que as vias de sinalização desencadeadas por esse gene também podem ser reguladas positivamente, o que contribui para alta proliferação celular que é característica do fenótipo agressivo observado na crise blástica da LMC .

Por outro lado, os genes *PAN3*, *TOB1* e *ITCH* tiveram a expressão reduzida em células de LMC. Esses genes têm uma correlação importante, pois eles estão envolvidos em vias relacionadas à deadenilação da cauda poli A(*PAN3*) e eventos de transdução de sinal (*ITCH*); ambos estão envolvidos em vias moleculares nas quais *TOB1* também pode estar envolvido. A *ITCH* é uma proteína envolvida na regulação positiva de sinalização de TGF- β por eventos de transdução de sinal de modulação proximais incluindo a associação de receptor de TGF- β com Smad2 e subsequente fosforilação de Smad2 (Naka, Hoshii et al. 2010). Essa associação pode estar envolvida na regulação da proliferação, diferenciação, adesão, migração de células e outras funções em diferentes tipos de celulares. O gene *PAN3* está envolvido na tradução de uma proteína envolvida na organização da produção mRNA, sendo que esse processo envolve duas fases consecutivas, mediadas pelo PAN2-PAN3 e os complexos de CCR4-Caf1. Nesse processo, a proteína TOB1 interage simultaneamente com o complexo poli(A) de CCR4(nuclease)-CAF1(citoplasmática) e o poli (A) da proteína de ligação PABPC1, aumentando deadenilação de mRNA *in vivo* (Ezzeddine, Chang et al. 2007)

Não há dados na literatura sobre a relação de *TOB1* e LMC, entretanto estudos sugerem que esse gene atue como supressor de tumor em varios tipos de câncer. Embora esse gene tenha baixa expressão descrita em diferentes tipos de câncer, os efeitos sobre atividades como proliferação celular e metástase *in vitro* e *in vivo* ainda são mal compreendidos, e as vias de sinalização e mecanismos relacionados permanecem obscuros.

O gene *TOB1* foi encontrado associado à regulação de Smad2 e Smad4, com isso aumentando a ligação de SMAD ao promotor de IL-2, conduzindo a uma inibição de IL-2 e transcrição de DNA (Tzachanis, Freeman et al. 2001). Foi relatado que a expressão diminuída de *TOB1* é necessária para que haja ativação de células T e sua expansão (Ezzeddine, Chang et al. 2007), na LMC talvez seja possível fazer essa correlação entre

pacientes durante a progressão de doença com a diminuição da expressão. A desregulação destas vias, SMAD 2 e 4, pode estar envolvida no desenvolvimento de LMC de modo que esse pode ser um potencial gene alvo para investigação no tratamento de doentes com LMC.

O gene *PAN3* está envolvido na tradução de uma proteína envolvida na organização da produção mRNA. Esse processo envolve duas fases consecutivas, mediadas pelo PAN2-PAN3 e os complexos de CCR4-Caf1. Nesse processo, a proteína TOB1 interage simultaneamente com o complexo poli(A) de CCR4(nuclease)-CAF1(citoplasmática) e o poli (A) da proteína de ligação PABPC1, aumentando deadenilação de mRNA *in vivo* (Ezzeddine, Chang et al. 2007)

Não há dados na literatura sobre a expressão de *TOB1* na LMC. Recentemente Kundu et al. mostraram que *TOB1* atua induzindo a apoptose e inibe a proliferação, migração e invasão de células cancerígenas através da ativação de Smad4 em vias gástricas e inibindo a sinalização de β -Catenina. Por outro lado, o silenciamento de *TOB1* induz a fosforilação de AKT e aumenta a expressão de β -Catenina (Kundu, Wahab et al. 2012).

Esse resultado sugere que a expressão diminuída de *TOB1* em pacientes NOCgR pode ser indicativo de desregulação da apoptose e de vias de sinalização importantes nessa doença incluindo a via da AKT, conduzindo assim a resistência aos ITK's. A proteína TOB1 pode também participar em diferentes vias, por ativação direta ou indireta, causando alterações na expressão. Uma das possibilidades é através da ativação do complexo RAS (EGF) capaz de ativar as vias PI3K-AKT/mTOR e MAPK que são vias ativadas pelo oncogene *BCR-ABL*. Jiao *et al.* relataram que a via PI3K/PTEN, além de ser essencial para a carcinogênese, angiogênese e metástases, pode ser um dos possíveis caminhos de sinalização para o controle da proliferação e metástase de células de cancer do pulmão, sendo esta via regulada por *TOB1 in vitro* (Jiao, Sun et al. 2012).O oncogene BCR-ABL pode ativar as vias de SHC e GRB2 (que atua sobre ERK 1/2) (Figura 27). Essas vias estão também relacionadas com a ativação de uma cascata de vias metabólicas associadas à síntese proteica, expressão gênica, sobrevivência, motilidade e invasão tecidual, proliferação celular e a transformação de células normais em células de LMC, fazendo aqui um link com o fato de os pacientes resistentes mostrarem um nível menor de expressão desse gene. Além disso, a via RAS é importante na patogenia das leucemias Ph+ por estar

associada a ativação de mutações na fase blástica da doença (Deininger, Goldman et al. 2000).

Devido a esses fatores, a criação de estratégias que levam ao melhor entendimento da fisiopatologia da doença e melhora no tratamento da LMC deve ser focada em vários genes alvos e não apenas no *BCR-ABL*, pois no desenvolvimento dessa patologia está envolvida a ativação e desativação de várias vias de sinalização celular. Todavia, assim como Kundu et al. e Jiao et al., seria possível esclarecer o mecanismo de atuação desses genes fazendo uma vasta gama de ensaios funcionais em células leucêmicas e *BCR-ABL*⁺ e, em posse desses resultados, dimensionar tal potencial de regulação em vias de sinalização de grande importância em LMC. E diante de tantos estudos abordando esse gene, seria o *TOBI* um possível marcador prognóstico ou gene alvo em LMC? Deste modo, o segundo capítulo foi trilhado na tentativa de elucidar tais questões.

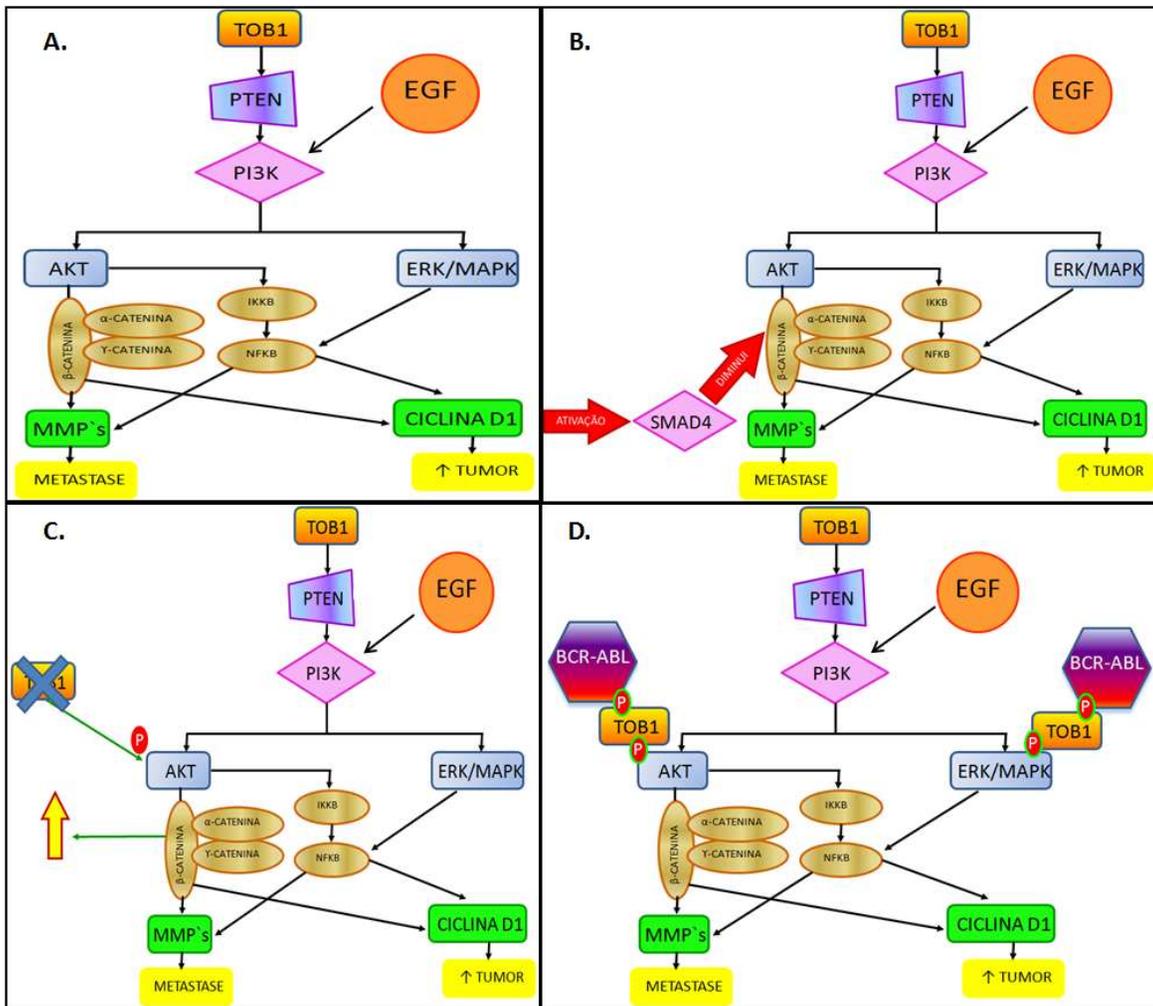


Figura 27: Esquema dos possíveis mecanismos de atuação de *TOB1* em *PTEN* e nas vias *AKT* e *ERK/MAPK*. A- *TOB1* atua sobre *PTEN* que por sua vez atua sobre *PI3K* que está ligado a *EGF* e seus receptores agem em *AKT* e *ERK/MAPK* levando a ativação do gene *NFKB* aumentando a expressão de *Ciclina D1* e *MMP's*. *AKT* inibe a expressão de β -Catenina. B- *TOB1* ativa *SMAD4* que passa a inibir β -Catenina em câncer gástrico. C- A inibição de *TOB1* induz a fosforilação de *AKT* e consequente aumento de β -Catenina em câncer gástrico. D- A hipótese é que também em *LMC* *TOB1* atue sobre essas vias de sinalização a partir de sua ativação pelo *BCR-ABL*.

CAPÍTULO II – *TOBI* E *SEPT5*: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO GÊNICA NA PROLIFERAÇÃO, CLONOGENICIDADE, APOPTOSE, CICLO CELULAR E VIAS METABÓLICAS; PERFIL DA EXPRESSÃO DESSES GENES EM LINHAGENS CELULARES HUMANAS E DE CAMUNDONGOS; E AVALIAÇÃO DA ADESÃO CELULAR DE GRANULÓCITOS DE PACIENTES E INDIVÍDUOS CONTROLE.

É sabido que fenômenos como a proliferação, diferenciação e apoptose de células hematopoiéticas normais e leucêmicas são regulados, dentre outros fatores, por estímulos extracelulares de citocinas e interações com o microambiente. A resposta a esses estímulos é transmitida da membrana celular ao núcleo através de vias de transmissão de sinalização celular (Steelman, Pohnert et al. 2004; Kornblau, Womble et al. 2006). A sinalização anormal resulta de mutações, alteração de expressão ou ativação dos componentes das vias de sinalização, com consequente alteração nos processos celulares, gênicos e proteicos (Reuter, Morgan et al. 2000; Gilliland and Tallman 2002; Steelman, Pohnert et al. 2004).

Em alguns dos relatos que há, foi descrita uma relação entre *TOBI* e a radiosensibilização em células de câncer de pulmão, sugerindo que esse gene seja um alvo molecular que modula a atividade dessas células a partir das vias MAPK/ERK e aumento da fosforilação de P53 (Che, Lu et al. 2013; Sun, Zhong et al. 2013). O gene *SEPT5* já foi repetidas vezes encontrado em neoplasias mielóides em crianças e adultos, porém sua associação clínica com a patogenia dessas doenças permanece sem esclarecimentos (Cerveira, Bizarro et al. 2011).

Vários genes e proteínas tem fundamental importância no processo de transformação neoplásica e em diferentes processos em células hematopoiéticas - como a associação de AKT, CRKL, JAK, BAD, ERK e PI3K com a oncoproteína BCR-ABL na LMC - (Baran and Saydam 2012) . Além disso, não existe na literatura uma relação clara entre os genes *TOBI*, *SEPT5* e o desenvolvimento ou progressão da LMC então surgiu à necessidade de avaliar qual seria o papel funcional e expressão desses genes em células BCR-ABL.

Para isso foi realizado o silenciamento (inibição) dos genes utilizando vetores lentivirais, os ensaios funcionais: *Western Blot* para avaliação das proteínas, MTT para estudo da proliferação celular, ensaio de formação de colônia para pesquisa de clonogenicidade, avaliação do ciclo celular, além da pesquisa da atividade apoptótica, estudo da adesão de granulócitos além da caracterização da expressão de *TOBI* e *SEPT5* em diferentes tipos celulares.

Casuística e Métodos

Pacientes

Dentre os pacientes incluídos no estudo, como expresso anteriormente, foram usadas amostras de leucócitos totais e mononucleares de 25 pacientes, amostra de medula óssea de 18 pacientes e amostras dos mesmos 20 indivíduos controles utilizadas para os experimentos do capítulo I e 12 doadores de medula óssea.

Coleta da medula óssea

A coleta de medula óssea foi feita pelo médico responsável no dia em que o paciente necessitava de coletar algum dos exames de rotina que utiliza o material da medula óssea como substrato. Já os doadores de medula óssea tiveram seu material coletado imediatamente após o término da doação.

Processamento do material da medula óssea

Para obtenção de RNA das células de medula óssea (MO), estas foram coletadas em tubo contendo anticoagulante EDTA e submetidas à lise de hemácias com tampão contendo cloreto de amônio. A seguir, as células foram submetidas à extração de RNA – conforme descrito no capítulo I.

Linhagens celulares humanas

Para a caracterização da expressão dos genes *TOBI* e *SEPT5* foram utilizados os RNA's de 15 linhagens celulares humanas adquiridas no banco de linhagens ATCC, Philadelphia, USA (Tabela IV).

Tabela IV: Descrição das linhagens humanas usadas neste estudo.

Linhagem	Descrição
MOLT4	LLA T
HL60	Leucemia mielocítica aguda
Jurkat	LLA T
Raji	LLA B/Linfoma de Burkitt
Daudi	LLA B/Linfoma de Burkitt
P39	Leucemia mielomonocítica
K562	Leucemia mieloide crônica em fase blástica, t(9;22)
NB4	Leucemia promielocítica aguda, t(15;17)
KU812	Leucemia mieloide crônica em fase blástica, t(9;22),+der(9)t(9;22),
HEL	Eritroleucemia
NALM	Leucemia mieloide crônica em fase blástica, t(9;22)
KARPAS	Linhagem celular T, CD4+
NAMALWA	Linfoma de Burkitt
V937	Linfoma Histiocítico
THP1	Leucemia monocítica aguda

Cultura das linhagens celulares BaF3^{wild type}, BaF3^{BCR-ABLp210}, BaF3^{T315I}

A cultura para proliferação das linhagens celulares de murino BaF3^{wild type}, BaF3^{BCR-ABLp210}, BaF3^{T315I} foi realizada em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal e 50 µg/mL de estreptomicina (Gibco). As células foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ durante 7 dias, sendo que a cada dois dias as células eram centrifugadas e colocadas em novo meio de cultura suplementado. Estas células foram gentilmente cedidas pelo Dr. Brian Druker, do Howard Hughes Medical Institute, Oregon Health and Science University dos Estados Unidos.

Padronização da concentração de Puromicina

Anterior aos experimentos de silenciamento de RNA foi necessário fazer a padronização da concentração do antibiótico puromicina para se estabelecer a concentração mínima necessária desse antibiótico que permita a seleção das células transfectadas com lentivírus.

A concentração de Puromicina foi padronizada de acordo com o protocolo do *pSilencer 5.1-U6 Retro* (Ambion) para que células K562, NB4 e KU812 que recebessem o lentivírus após transfecção pudessem ser selecionadas. Foi testada em culturas concentrações de Puromicina

entre 0 e 5,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0/0,5/1,0/1,5/2,0/2,5/3,0/4,0/5,0) e avaliadas no 3°, 5°, 8°, 10° e 14° dia de incubação a 37°C, 5%CO₂.

Células com expressão estável de shRNAs podem ser selecionadas por meio de antibióticos, pois muitos vetores contêm marcadores de resistência aos mesmos (Tuschl and Borkhardt 2002; Mittal 2004). Para a utilização de um vetor viral contendo o plasmídeo com o inserto de interesse, é necessária a utilização do antibiótico puromicina para a seleção das células que contém o plasmídeo. A menor concentração de puromicina que permitiu morte celular total das células que não continham o inserto após 48h de cultura foi de 2,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para K562, 0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para NB4 e 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para a KU812. Dessa forma, tais concentrações foram escolhidas como ótimas para selecionar as células transfectadas.

Transfecção das células K562, NB4 e KU812 usando lentivírus

Para a transfecção do plasmídeo contendo a molécula interferente para os genes de interesse por meio de lentivírus foi utilizado o Kit shRNA(h) Lentiviral Particles (Santa Cruz). As partículas lentivirais já estão prontas para o silenciamento do gene de interesse - um lentivírus específico para cada gene de interesse - pois são providas de 3 a 5 construções plasmidiais com inserto das sequências alvo específicas. Tais insertos são formados por 19 a 25 nucleotídeos para o silenciamento do gene de interesse. Da mesma forma, as partículas controle apresentam plasmídeos semelhantes, porém sem o inserto interferente. A Figura 28 representa o processo de transdução pelas partículas virais e o mecanismo de ação do RNA de interferência.

Para o processo de transdução foram utilizados 40 μl de vírus (estoque de 200 μl , 1×10^6 unidades virais de infecção) para 5×10^4 células em 2 ml de meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. Para a melhor interação entre a partícula viral e a célula a ser transduzida foi utilizado o reagente Polibrene® (Sigma, St. Louis, MO, EUA) a 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Após esses produtos serem adicionados foi realizado o processo chamado de espinoculação, no qual o recipiente contendo o meio de cultura, as células a serem transfectadas, as partículas virais e o polibrene, foi centrifugado a 800g, 30°C por 60 minutos. Após a centrifugação, o material foi incubado em placa de 24 wells, por 4h em estufa 37°C a 5% de CO₂. Prosseguiu-se com uma nova centrifugação a 1500 rpm, 25°C por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 500 μl de meio de cultura com soro fetal bovino e deixado na estufa

37°C/5%CO₂ por 72 horas em placa de 24 wells. Posteriormente foi adicionado o antibiótico puromicina para a seleção das células que apresentavam o plasmídeo de interesse.

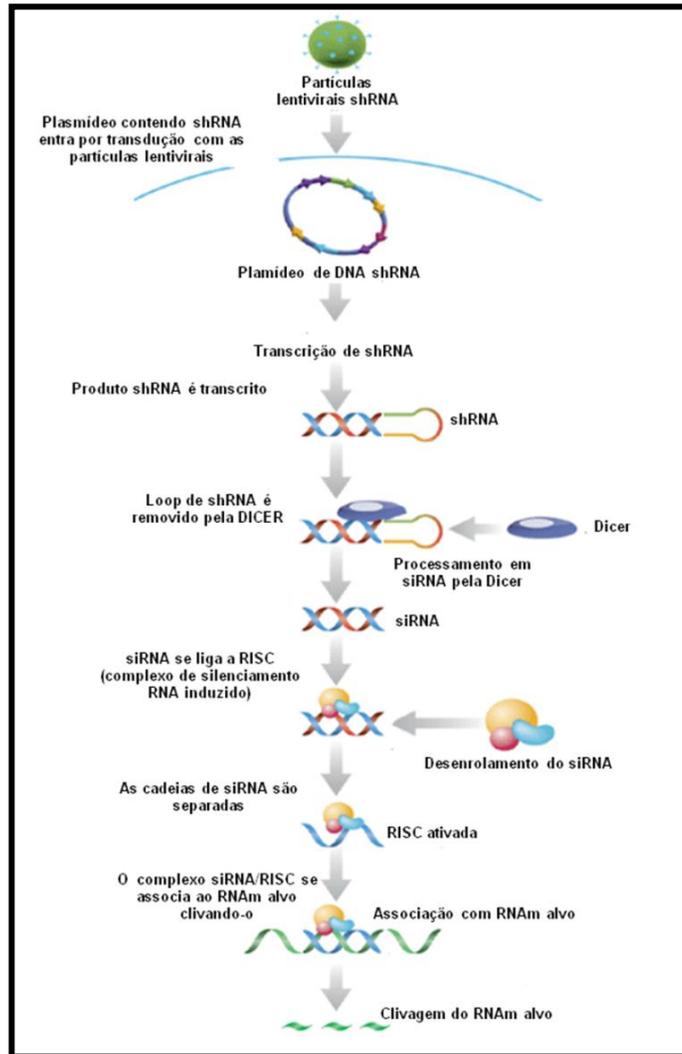


Figura 28: Mecanismo de ação da interferência de RNA a partir de shRNAs.

Culturas de linhagens celulares K562, NB4 e KU812

As linhagens K562, NB4 e KU812 são linhagens eritroleucêmicas que quando estimuladas essas células são capazes de se diferenciar em células da linhagem mielóide como eritrócitos, granulócitos e megacariócitos (Tabela V).

Garrafas de cultura (Nunc, Naperville, IL, USA) contendo 1×10^7 células por 75cm² de cada uma das linhagens, separadamente, foram mantidas em meio RPMI (GibcoBRL Life Technologies, Grand Island, NY, USA), suplementado com 10% de soro bovino fetal, 100U/ml penicilina (GibcoBRL) e 100mg/ml streptomicina (Gibco BRL).

As culturas foram mantidas em atmosfera umidificada a 5% CO₂ e temperatura de 37°C. Transfecções de DNA foram realizadas utilizando lentivírus de acordo com as recomendações do fabricante (Santa Cruz). Depois da transfecção por lentivírus, cada uma das linhagens celulares foram divididas em 3 grupos, cada um avaliado em 3 experimentos independentes executados em duplicata. O grupo 1 é representado pelas células não transfectadas (células controle) e os grupos 2 e 3 foram, respectivamente, células transfectadas com plasmídeo sem a sequência de RNA interferente (células controle negativo – shControle/shCTRL) e células transfectadas com o plasmídeo que expressa shRNAs específicos para *TOB1* ou *SEPT5*.

Após a 72hs da transfecção, 2,0µg/mL/ 0,3 µg/mL/ 1 µg/mL de puromicina foram adicionados ao meio de cultura contendo as linhagens celulares K562, NB4 e KU812 respectivamente. Depois da morte total do grupo 1, avaliada por Azul de Trypan (0.4%, Gibco), durante a cultura dos outros grupos celulares, amostras de RNA e proteína foram coletadas em diferentes pontos para confirmar o silenciamento. A morfologia das células foi analisada nestes pontos através de lâminas de citospin coradas com Leishman, a viabilidade através da coloração com azul de trypan em câmara de Neubauer.

Tabela V: Descrição das linhagens leucêmica utilizadas para o silenciamento.

Linhagem	Descrição	Célula Diferenciada
K562	LMC em fase blástica, t(9;22)	Megacariócito
NB4	Leucemia promielocítica aguda, t(15;17)	Granulócito
KU812	LMC em fase blástica,t(9;22),+der(9)t(9;22),	Eritrócito

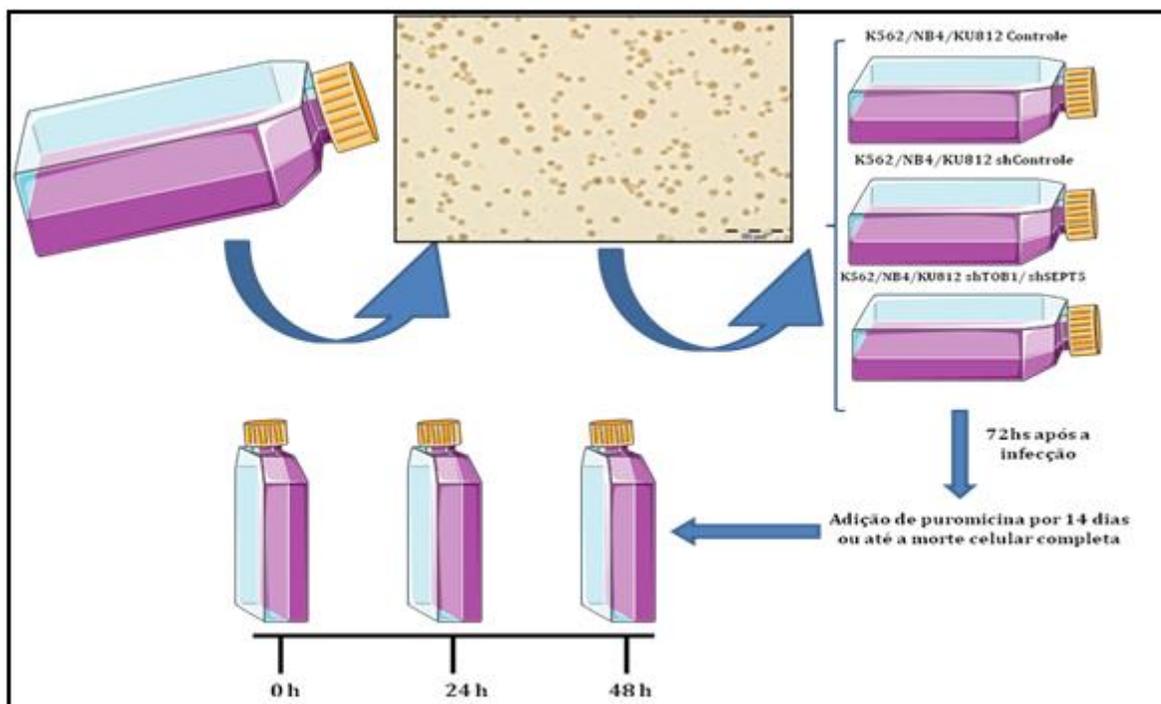


Figura 29: Esquema da cultura das linhagens celulares K562, NB4 e KU812- As culturas foram realizadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal e divididas em três garrafas, cada uma delas caracterizando um grupo experimental. 72 horas após a infecção com o lentivírus específico foi adicionado o antibiótico puromicina durante 14 dias com o objetivo de selecionar as células que receberam o inserto. Após o 14º dia, foi coletado um ponto inicial chamado 0h, posteriormente às 24hs e 48hs para a retirada de material para extração de RNA total e proteína. As células foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂.

Avaliação do silenciamento por qPCR

Nos itens que se referem a avaliação por qPCR serão mencionadas apenas as informações que diferem das descritas no capítulo anterior.

Extração de RNA

O RNA de todas as amostras foi extraído utilizando o método de extração com Kit comercial – Rneasy Mini e Micro Kit (Qiagen GmbH, Hilden) segundo as instruções do fabricante.

Síntese de cDNA

As amostras de RNA foram submetidas à síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando-se o kit RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Life Sciences). Para transcrição, utilizou-se 3 µg de RNA que foram tratados com a enzima DNase I (Invitrogen, Life Technologies) para remoção de DNA contaminante. O tratamento com DNase consistiu na adição de 1,0 µl de 1u/µl DNaseI, 1,0 µl de 10x DNaseI *Reaction Buffer* (200mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, 500 mM KCl₂) e água suficiente para um volume final de 10,0 µl de reação. As amostras foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente e a reação bloqueada com a adição de 1,0 µl de 25 mM de EDTA com posterior incubação por 10 minutos a 65°C. Após essa etapa, iniciou-se a síntese do cDNA complementar com a adição de 1,0 µl de 50 µM Oligo(dT) Primer, incubação por 5 minutos a 65°C. Posteriormente, foram adicionados 4,0µl de 5X Reaction Buffer, 2,0 µl de dNTP Mix, 10 mM, 1,0 µl de RiboLock™ RNase Inhibitor e 1,0 µl de RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase. A reação ocorreu por 60 minutos a 52°C, seguida de 5 minutos a 70°C. Os primers dos genes de interesse utilizados nesta etapa foram os mesmos utilizados para a realização do experimento descrito no capítulo anterior.

Western blot

Ao precipitado celular contendo 5×10^4 a 1×10^7 células foi acrescentado tampão de extração de proteínas contendo 100 mM Tris (pH 7.6), 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 0,1 mg Aprotinina, 35 mg PMSF/mL, 10 mM Na₃VO₄, 100 mM NaF, 10 mM Na₄P₂O₇, e 4 mM EDTA. As amostras foram homogeneizadas até que se tornassem bastante fluidas. Após 30 minutos a 4°C, essas amostras passaram por um processo de centrifugação a 4°C durante 20 minutos para remoção dos restos celulares. Ao produto do extrato total proteico, adicionou-se tampão de Laemmli contendo 100 mmol/L de ditioneitol e foi colocado em banho seco por 4 minutos a 95°C. Após isso, as amostras foram submetidas à eletroforese ou armazenadas a -80°C.

A eletroforese de proteínas foi feita em gel de poliacrilamida 8% a 10% -SDS-PAGE em aparelho de eletroforese (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca) em duas etapas sendo a primeira de 30 minutos a 40V (para desempacotamento das proteínas) e a segunda 60 minutos a 120 V. A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana em aparelho miniaturizado de transferência da Bio-Rad durante 90 minutos a 120V (constantes). A ligação dos anticorpos a proteínas não específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana por 1

hora com tampão de bloqueio (5% leite em pó magro Molico®- Nestle, 10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, e 0.02% Tween 20) a 4°C. A membrana de nitrocelulose foi então incubada com anticorpos específicos diluídos em tampão (0.3% de leite em pó magro Molico®- Nestle) por 12 horas a 4°C e então sofreram 3 lavagens de 10 minutos em solução basal (10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, e 0.02% Tween 20).

Os anticorpos primários utilizados foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA): anticorpos monoclonais que reconhecem especificamente cada um dos genes de interesse - *Septin5* (sc-373903, sc-365271) e *TOB1* (sc-133095, sc-136969), além do anticorpo policlonal que reconhece a *Actina* (sc-1616). O sistema de revelação usado foi baseado em quimiluminescência, e realizado de acordo com orientações do fabricante, ECL™ *Western Blot* Analysis System (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Em suma, as membranas foram incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário, conjugado à *Actina*, lavadas novamente, e então submetidas ao substrato da enzima, resultando em um produto luminescente, detectado por autorradiografias em filmes Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY). A intensidade de expressão proteica foi normalizada pela expressão da Actina.

Também foram utilizados os anticorpos monoclonais que reconhecem a fosfotirosina (p-Tyr) (sc-508), p-ERK (sc-7383), P70S6K (sc-8418), CRKL (sc-319) e anticorpos policlonais que reconhecem Akt1/2 (sc-8312) e BAD (sc-943). Anticorpos monoclonais que reconhecem p-Akt (9271) e p-CRKL (3181) foram obtidos da Cell Signaling Technology (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) e Anti-ERK1/2 (13-6200) da Zymed (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A intensidade de expressão protéica foi normalizada pela expressão da actina e a intensidade da fosforilação protéica foi normalizada pela expressão da proteína correspondente.

Methylthiazoletetrazolium (MTT)

A proliferação celular foi mensurada pelo ensaio de Methylthiazoletetrazolium (MTT; Sigma, St. Louis, MO, EUA). Células shControle, shTOB1 e shSEPT5 foram submetidas à privação de soro fetal bovino (SFB) à 0.5% por 12 horas. Um total de $2,5 \times 10^5$ células por poço foram plaqueadas em uma placa de 96 poços em meio RPMI 10% SFB na ausência ou presença de diferentes concentrações de mesilato de imatinibe (0 e 1 μ M) por 48 horas. Em resumo, 10 μ L de uma solução à 5mg/mL de MTT foram adicionadas nos poços e incubadas à 37°C por 4 horas. A reação foi parada pela adição de 100 μ L de 0,1N HCl em isopropanol. O crescimento celular foi

avaliado pela mensuração da absorbância a 570 nm, utilizando um leitor automático de placas (equipamento geralmente utilizado para leitura de Elisa). Todas as condições foram testadas em seis replicatas.

Ensaio de formação de colônia

Esse ensaio foi realizado em meio semissólido de metilcelulose ($0,5 \times 10^3$ células/mL; MethoCult 4230; StemCell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada). As colônias foram detectadas após oito dias de cultura pela adição de 1mg/mL de reagente MTT e as contagens foram realizadas com o auxílio do *Image J quantification software* (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Células transfectadas foram submetidas ao ensaio de formação de colônias na ausência ou presença de mesilato de imatinibe (0 e 1 μ M). Todas as condições foram testadas em triplicatas.

Análises do ciclo celular

As células foram fixadas em etanol 70%, por pelo menos 2 horas à 4°C antes das análises e incubadas com 20 μ g/mL de iodeto de propídio (PI) contendo 10 μ g/mL de RNase A por 30 minutos à temperatura ambiente. As análises da fluorescência celular foram realizadas com um FACSCalibur (Becton–Dickinson, CA, USA). Os resultados das distribuições do DNA foram analisados pelo Modifit (Verify Software House Inc., Topsham, ME, USA) para se determinar as proporções de células nas fases do ciclo celular.

Avaliação de apoptose usando anexina-V e PI

Células transfectadas foram semeadas em placas de 12 poços e tratadas com diferentes concentrações de mesilato de imatinibe (0 e 1 μ M) por 48 horas. As células foram então lavadas duas vezes com PBS gelado e ressuspensas em tampão de ligação contendo 1 μ g/mL de PI e 1 μ g/mL de FITC anexina-V (Becton–Dickinson, CA, USA). Após incubação no escuro durante 15 minutos em temperatura ambiente, todas as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur. Dez mil eventos foram adquiridos para cada amostra.

Avaliação da atividade de Caspases 3, 8 e 9

A atividade da caspase 3, caspase 8 e caspase 9 foi medida conforme as instruções recomendadas pelo fabricante (Calbiochem, LaJolla, CA, EUA). As células transfectadas foram semeadas em placa de 6 poços e tratadas ou não com diferentes concentrações de mesilato de imatinibe (0 e 1 μM) por 48 horas. As células ($2,5 \times 10^5$ células/mL) foram incubadas com: FITC-DEVD-FMK (1:300) para caspase 3, FITC-IETD-FMK (1:300) para caspase 8 e FITC-LEHD-FMK (1:300) para caspase 9; em meio não suplementado durante 60 minutos a 37°C em atmosfera úmida a 5% de CO₂. As células foram então lavadas, ressuspensas em meio não suplementado e conservadas em geladeira até o momento da leitura. Após isso, foram analisadas por citometria de fluxo usando o canal FL-1 no aparelho FACSCalibur.

Adesão celular em fluxo

Foi utilizado o sistema Cellix VenaFlux platform™ que permite a realização de ensaios *in vitro* mimetizando situações *in vivo* que ocorrem no fluxo sanguíneo. A plataforma utiliza um sistema de biochips com até 8 canais que são revestidos com proteínas da matriz extracelular (nesse caso a fibronectina) como agente ligante. Uma nanobomba é utilizada para emitir um fluxo contínuo, produzindo a força exercida pelo fluxo sanguíneo humano considerada normal nos capilares do mesmo diâmetro dos usados no aparelho ($0,5 \text{d}/\text{cm}^2$), e a adesão destas células ao canal pode ser observada através de um microscópio invertido. A análise das imagens adquiridas é feita através do *software DucoCell™* que quantifica parâmetros morfométricos das células (Figura 30).

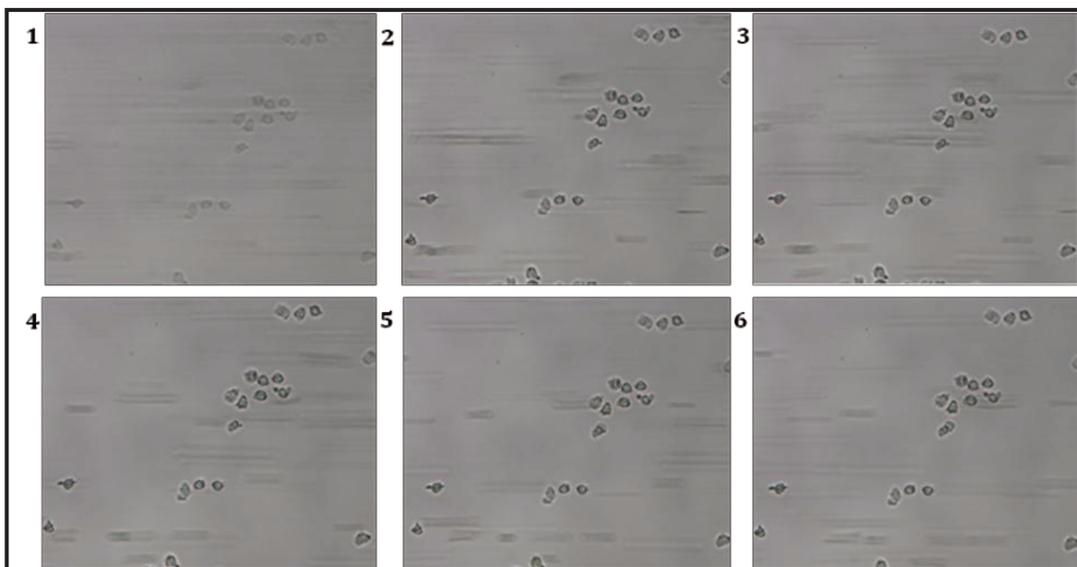


Figura 30. Sequência de fotografias tiradas no aparelho Cellix VenaFlux platform™ em um experimento de adesão de granulócitos em seis tempos diferentes em um campo.

Ensaio de adesão em fluxo e interpretação dos resultados

Primeiramente o biochip foi preparado adicionando-se 10 μ L do ligante Fibronectina 20 μ g/mL em cada canal, em seguida o chip foi incubado em uma câmara úmida à TA por 2hs. Após este período, os canais do biochip foram bloqueados com BSA 1% por 30 minutos, e lavados duas vezes com PBS.

Cerca de 35 μ L da suspensão celular de granulócitos contendo 5x10⁶ cels/mL foram dispensados nos canais do biochip e então foi iniciado o fluxo de células, nos 3 minutos iniciais dispensou-se os granulócitos, tirando fotos nos primeiros 10 segundos e nos 2'40'' para contagem e comparação do número de granulócitos, em seguida iniciou-se a tiragem sequencial de fotos a cada segundo. O número de células aderidas foi avaliado em três diferentes posições do canal e todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Resultados

Cultura e transfecção das linhagens celulares K562, NB4 e KU812

As linhagens celulares K562, NB4 e KU812 foram proliferadas por 7 dias e mantidas nesse período apenas em meio de cultura RPMI enriquecido com 10% de soro fetal bovino.

Houve proliferação celular, com maior porcentagem de células vivas em relação às células mortas visualizadas pela contagem em câmara de Neubauer com azul de Trypan.

Essas células apresentaram crescimento formando grumos, e ao final deste período de 7 dias pode-se observar que as células estavam em fase exponencial de proliferação, possibilitando assim a realização dos experimentos pretendidos.

Após ser realizada a infecção das células K562, NB4 e KU812, essas células foram mantidas em estufa por 72 horas e posteriormente foi adicionado o antibiótico puromicina até o 14º dia após esta infecção. No 14º dia, tempo que a cultura controle levou para ter a morte celular completa, tem-se a garantia de que todas as células que estão vivas são células infectadas, a partir desse momento foi colhido material para extração de RNA e proteína.

Para todos os ensaios funcionais que serão abordados neste capítulo, serão mostrados os resultados obtidos em relação ao gene *TOB1* e depois os resultados do gene *SEPT5*.

Avaliação do silenciamento dos genes por qPCR

Após a transfecção e seleção pelo antibiótico, foram coletadas amostras de cada uma das linhagens celulares para verificação da diminuição da expressão de cada um dos genes especificamente, confirmando assim se houve ou não um silenciamento eficiente. Os resultados refletem os valores de três experimentos independentes para cada um dos genes e para cada uma das linhagens. As barras shCTRL representam a expressão do gene estudado a partir de células controle, ou seja, aquelas em que foram inseridos apenas plasmídeos sem o inserto interferente e as barras shTOB1 e shSEPT5 representam a expressão do gene estudado a partir de células que apresentam o plasmídeo produtor do RNA interferente. A expressão dos genes estudados foi normalizada pelos controles endógenos *β -actina* e GAPDH, e os resultados foram analisados usando $2^{-\Delta\Delta CT}$.

A Figura 31 mostra a expressão gênica de *TOB1* em relação às culturas controles nas três linhagens celulares que foram transfectadas. Redução significativa na expressão gênica de *TOB1* em K562 ($78 \pm 3,6\%$) e NB4 ($83,7 \pm 2,6\%$) foi detectada nas células shTOB1 quando comparados com shCTRL. Nas células NB4 o silenciamento não foi efetivo.

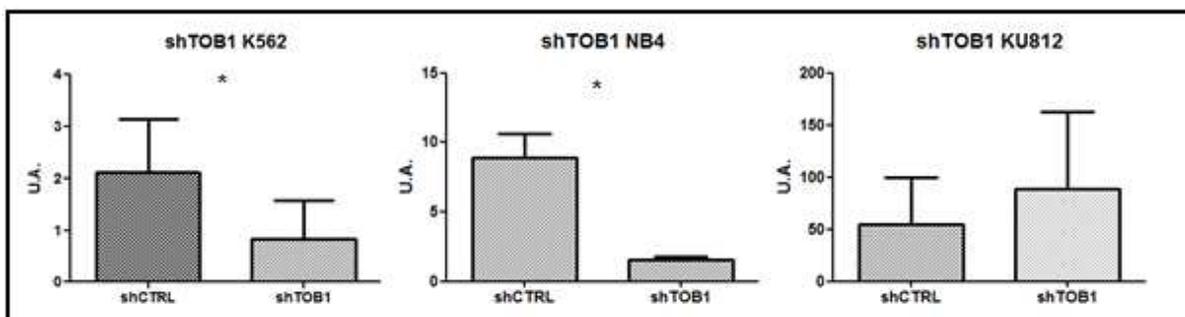


Figura 31. ShRNA específico para *TOB1* mediado por lentivírus resultou no silenciamento efetivo de *TOB1* em células K562 e NB4. Quantificação da expressão de *TOB1* nas células shTOB1 em relação a expressão das células shCTRL(Controle). Os gráficos de barras representam a média±DP de 3 experimentos independentes. * $P \leq 0.05$, teste *t student*.

A Figura 32 mostra a expressão do gene *SEPT5* em relação às culturas controles nas três linhagens celulares que foram transfectadas. Pode-se notar uma redução significativa na expressão de *SEPT5* em K562($80,2 \pm 2,1\%$), NB4 ($78,1 \pm 3,1\%$) e KU812 ($72,1 \pm 1,4$) detectada nas células shSEPT5 quando comparadas com shCTRL.

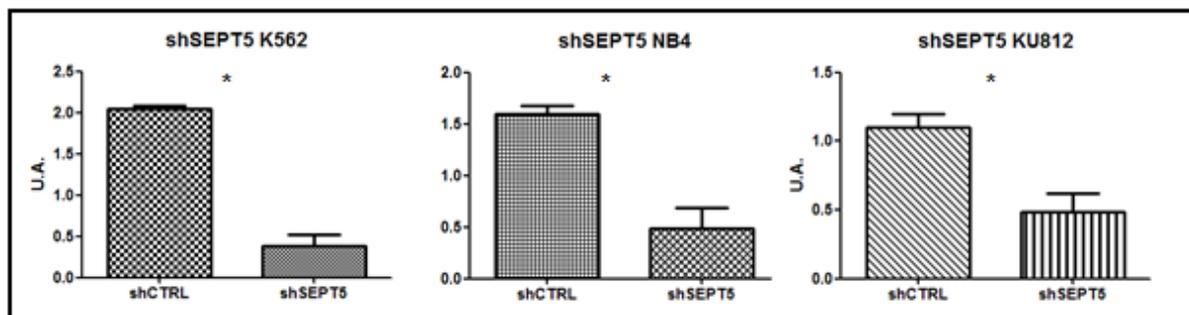


Figura 32. ShRNA específico para *SEPT5* mediado por lentivírus resultou no silenciamento efetivo de *SEPT5* em células K562, NB4 e KU812. Quantificação da expressão de *SEPT5* nas células shSEPT5 em relação a expressão das células shCTRL(Controle). Os gráficos de barras representam a média±DP de 3 experimentos independentes. * $P < 0.05$, teste *t student*.

Avaliação do silenciamento por Western blot

A expressão dos genes em estudo foi determinada por qPCR e Western blot. Foram realizados os westerns blots apenas na linhagem celular K562. Houve redução na expressão protéica de *TOB1* e *SEPT5* nas células inibidas – shTOB1 e shSEPT5 – quando comparada com shControle (Figura 33).

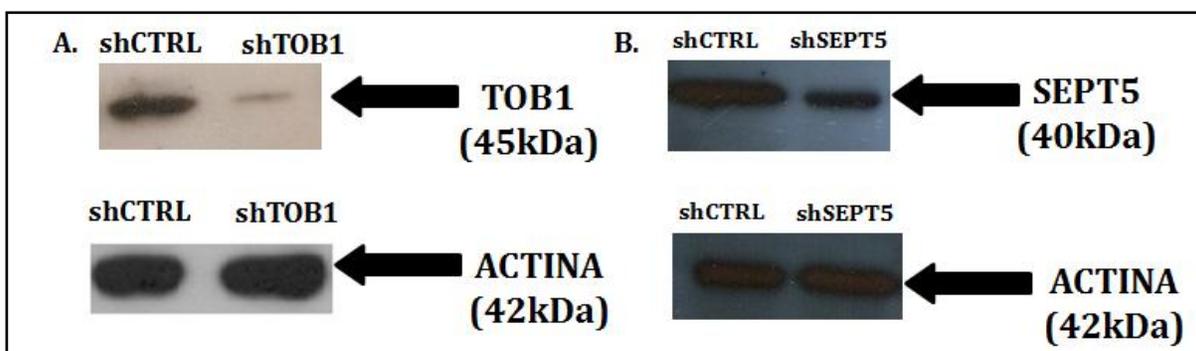


Figura 33. Análise do silenciamento gênico por Western Blot, a partir de extratos protéicos de células shTOB1, shSEPT5 e shControle. (A) A membrana foi incubada com anticorpos anti-TOB1 (45kDa), (B) anti-SEPT5 (40kDa) ou anti-Actina (42kDa) como controle da quantidade de proteína aplicada no gel.

Avaliação da proliferação celular usando Methylthiazoletetrazolium (MTT)

O efeito do silenciamento de *TOB1* e *SEPT5* na proliferação das linhagens celulares inibidas foi avaliado por MTT após 48 horas de cultura. Dessa forma, todas as células foram submetidas ao tratamento com imatinibe associado ou não ao silenciamento dos genes *TOB1* e *SEPT5*. Em todos os ensaios funcionais o tratamento com imatinibe teve como objetivo o controle positivo da eficiência dos métodos.

Em relação ao gene *TOB1*, a proliferação foi aumentada nas células shTOB1 quando comparadas às shControle tanto em K562 (gráfico A) quanto em NB4 (gráfico B) – Figura 34. Os resultados mostram que a proliferação celular, nesse caso, está relacionada ao silenciamento do gene em questão.

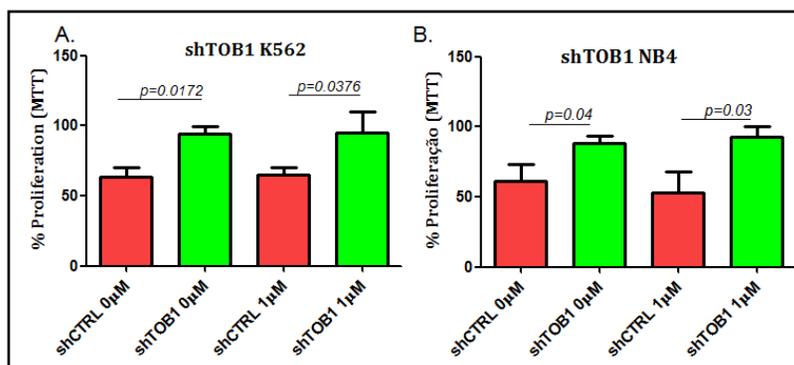


Figura 34: O silenciamento de *TOB1* aumenta a proliferação celular em células K562 e NB4 . A proliferação celular foi determinada pelo ensaio de MTT após 48 horas de incubação de células shTOB1 e shControle usando 0 e 1µM de imatinibe. Os resultados são apresentados como média±

DP de seis replicatas e é representativo de 3 experimentos independentes. Teste *t*, *Mann-Whitney*, $P \leq 0.05$.

Ao se avaliar o efeito do silenciamento de *SEPT5* na proliferação celular, nota-se que não houve alteração celular significativa em nenhuma das três linhagens avaliadas na população shSEPT5 em relação a shControle. Na figura a seguir são mostrados os resultados obtidos em relação às células K562 (gráfico A), NB4 (gráfico B) e KU812 (gráfico C) –Figura 35.

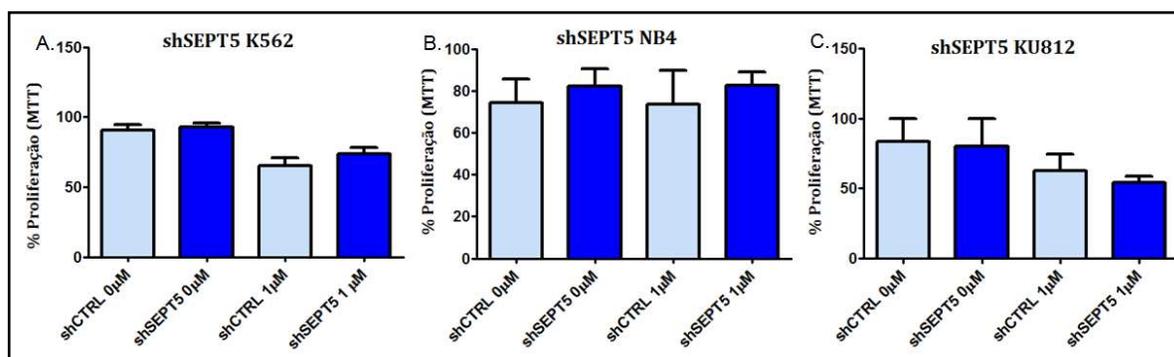


Figura 35. O silenciamento de *SEPT5* não altera a proliferação celular em células K562, NB4 ou KU812. $P \leq 0.05$ foi considerado significativo, teste *t*, *Mann-Whitney*.

Ensaio de formação de colônia

O ensaio de formação de colônias foi utilizado para determinar se o silenciamento dos genes em estudo é capaz de provocar alguma alteração no crescimento clonal de células K562, NB4 ou KU812.

Em relação ao gene *TOB1*, tanto na linhagem celular K562 quanto na NB4, houve um significativo aumento (K562: $p = 0.011$ / NB4: $p = 0.012$) no número de colônias formadas na cultura de células shTOB1 em comparação às células shControle (Figura 36). O tratamento com imatinibe não resultou em uma inibição dose-dependente na formação de colônias de células K562 e NB4. Esses resultados mostram que o silenciamento de *TOB1* nesses modelos celulares aumenta a capacidade de formação de novos clones.

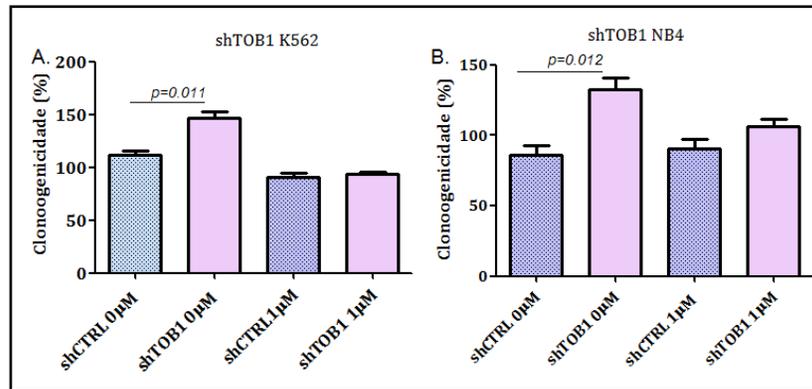


Figura 36. O silenciamento de *TOB1* aumenta a clonogenicidade em células K562 (A) e NB4 (B). Colônias contendo células viáveis foram detectadas pela adição de MTT após 8 dias de incubação de células shTOB1 e shControle na ausência ou presença de mesilato de imatinibe (0 ou 1 µM) em meio metilcelulose. Foi considerado significativo $p \leq 0.05$, teste *t*, *Mann-Whitney*.

Quando se inibe o gene *SEPT5* não se observam alterações significativas na formação de colônias em nenhuma das três linhagens avaliadas. Nas culturas da linhagem K562 o número de colônias formadas foi semelhante nas células shCTRL (colunas cinzas do gráfico A) e nas células shSEPT5 (colunas em branco do gráfico A) na ausência de imatinibe e com 1µM. Na avaliação das culturas de linhagens NB4 e KU812 pode-se notar uma pequena diminuição, porém não significativa, no número de colônias formadas nas células shSEPT5 na ausência de imatinibe. Quando se utiliza a dose de 1 µM de imatinibe o número de colônias formadas foi igual nas duas condições.

Esses resultados sugerem que, apesar de o gene *SEPT5* ter uma importante função na citocinese e multiplicação celular, sua inibição nesses modelos celulares não altera a clonogenicidade.

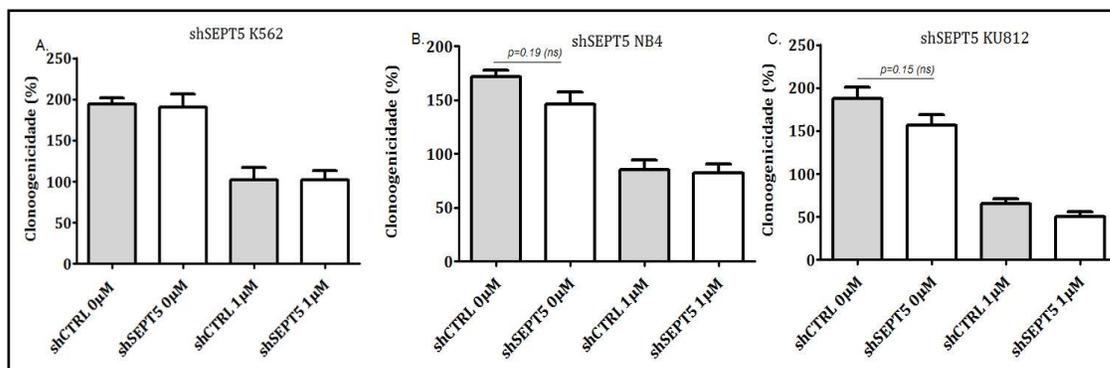


Figura 37. O silenciamento de *SEPT5* não altera a clonogenicidade em células K562 (A), NB4 (B) e KU812 (C). As diferenças observadas nos gráficos não foram significativas pelo teste *t student*, pois o valor de *p* foi considerado significativo quando $p \leq 0,05$.

Análises do ciclo celular

Os resultados da avaliação do efeito do silenciamento de *TOB1* no ciclo celular, feito por citometria de fluxo, mostraram um acúmulo significativo de células K562 e NB4 na fase S, com conseqüente diminuição das células na fase G₂ do ciclo celular em células shTOB1, quando comparadas às células shControle (Tabela VI e Tabela VII). A fase S é o período durante o ciclo celular no qual ocorre a replicação do DNA, correlacionando com os resultados encontrados na *SSH* observamos na biblioteca de LMC a alta produção de RNA polimerase II indicando que as células de LMC estão produzindo uma quantidade exagerada de proteínas utilizadas para a codificação da maioria dos genes em eucariotos.

Tabela VI. Efeito do silenciamento do gene *TOB1* nas fases do ciclo celular em K562

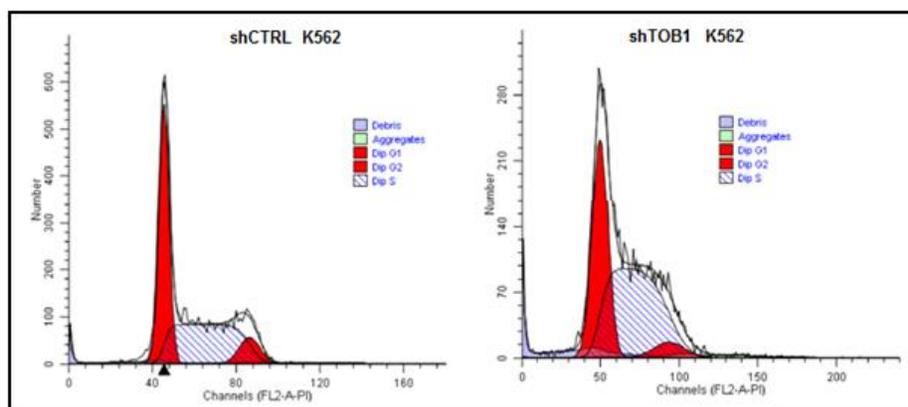
Célula K562	Fases do ciclo celular (%)		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
shControle	42.80±10.8	36.28±6.8	20.92±5.7
shTOB1	24.98±4.2*	65.82±7.3*	9.20±11.9*

* $p < 0,05$; teste *t student*.

Tabela VII. Efeito do silenciamento do gene *TOB1* nas fases do ciclo celular em NB4

Célula NB4	Fases do ciclo celular (%)		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
shControle	46.08±12.3	31.57±4.6	22.35±5.7
shTOB1	28.37±5.1*	72.01±2.4*	5.81±3.8*

* $p < 0,05$; teste *t student*.

**Figura 38:** Ciclo celular de células controles e células inibidas para *TOB1*.

O silenciamento de *SEPT5* em células K562 induziu a uma parada na fase G₀/G₁ e S, e diminuição de células na fase G₂/M do ciclo celular (Tabela VIII). Em células NB4 houve uma diminuição significativa no número de células que entraram na fase G₂/M em shSEPT5 (Tabela IX). Quanto à avaliação em KU812, não foram observadas alterações significativas entre shSEPT5 e shControle (Tabela X).

Tabela VIII: Efeito da inibição do gene *SEPT5* nas fases do ciclo celular em K562

K562	Fases do ciclo celular (%)		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
shControle	42.80±10.8	36.28±6.8	20.92±5.7
shSEPT5	38.94±8.4	60±5.1*	1.0±2.9*

* $p < 0,05$; teste *t student*.

Tabela IX: Efeito da inibição do gene *SEPT5* nas fases do ciclo celular em NB4

NB4	Fases do ciclo celular (%)		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
shControle	46.08±12.3	31.57±4.6	22.35±5.7
shSEPT5	50.56±6.1	45.0±11.9	4.72±6.0*

* $p < 0,05$; teste *t student*.

Tabela X: Efeito da inibição do gene *SEPT5* nas fases do ciclo celular em KU812

KU812	Fases do ciclo celular (%)		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
shControle	70.45±9.77	20±8.9	9.59±10.1
shSEPT5	64.96±2.4	26.85±7.91	8.19±5,71

* $p < 0,05$; teste *t student*.

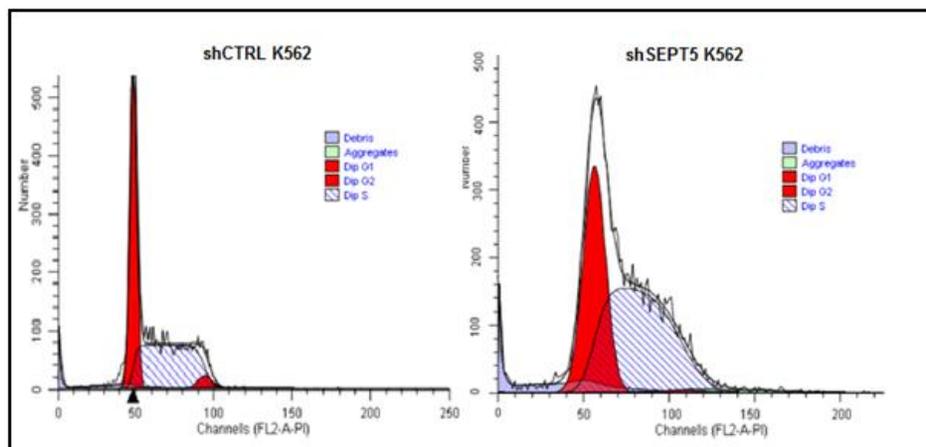


Figura 39: Ciclo celular de células K562 controle e silenciadas para *SEPT5*.

Avaliação da atividade de apoptose por marcação com anexina-V e PI

Para investigar os efeitos do silenciamento do gene *TOB1* e *SEPT5* sobre a alteração da apoptose celular, um dos métodos utilizados foi a taxa a avaliação por citometria de fluxo após incubação de células com anexina V/PI.

Ao analisarmos os resultados da inibição de *TOB1* em relação a apoptose de K562 e NB4 observamos que não houve diferença na porcentagem de células em atividade apoptótica entre as células shTOB1 e shControle (Figura 40).

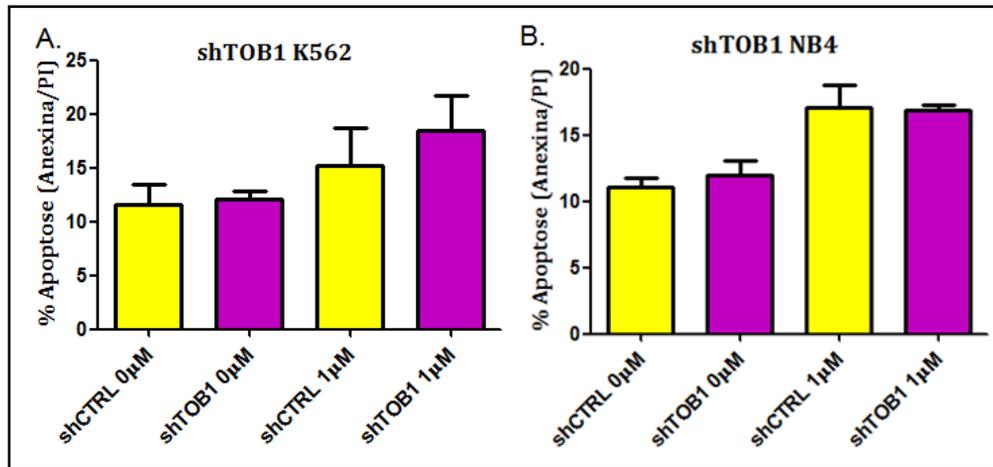


Figura 40. O silenciamento de *TOB1* não altera a atividade de apoptose e necrose celular em células K562 (A) e NB4 (B). A apoptose foi detectada por citometria de fluxo em células marcadas com anexina-V e PI. As diferenças observadas nos gráficos não foram significativas pelo teste *t student*, pois o valor de $p > 0,05$.

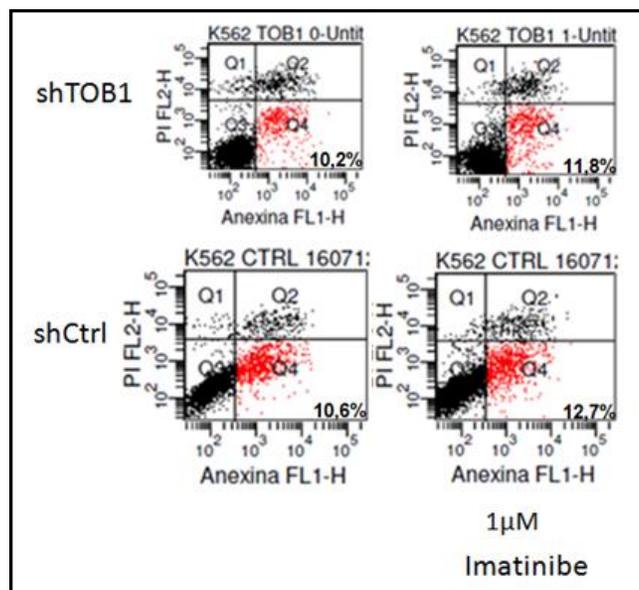


Figura 41: Citometria de fluxo para anexina V/PI em células K562 shCTRL e shTOB1.

Quando o gene *SEPT5* foi inibido, a atividade apoptótica se mostrou diminuída nas linhagens K562 e KU812 nas células shSEPT5 em relação as shControle, porém a diminuição em K562 não foi significativa. Em NB4 não houve alteração desta atividade nas células inibidas. Não houve sinergismo entre o tratamento com imatinibe e a inibição.

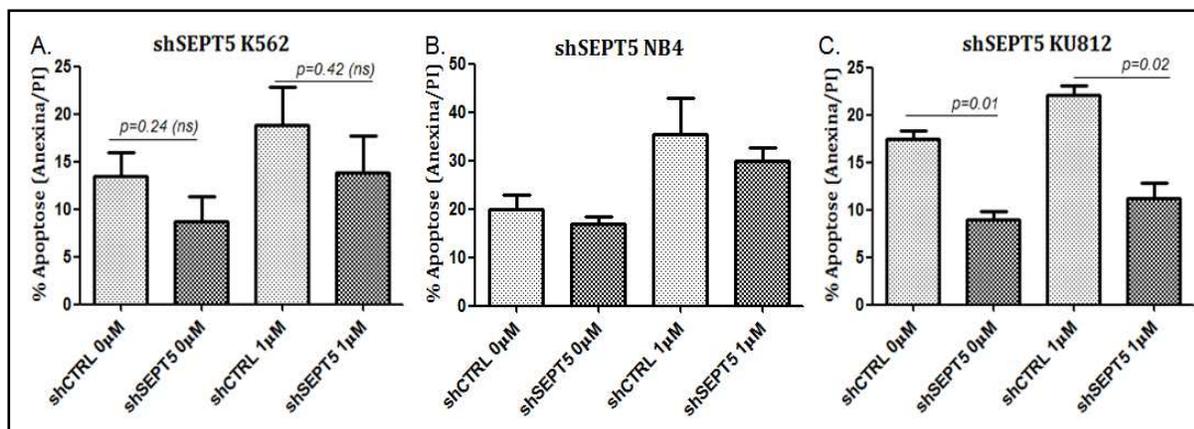


Figura 42. O silenciamento de *SEPT5* diminui a atividade de apoptose celular em células K562 (A) porém o valor de *p* não foi significativo, e KU812 (C) com *p* significativo. Em NB4 (B) não houve alteração da atividade apoptótica. As diferenças observadas no gráfico A não foram significativas. Teste *t*, *Mann-Whitney*, significativo $p \leq 0.05$.

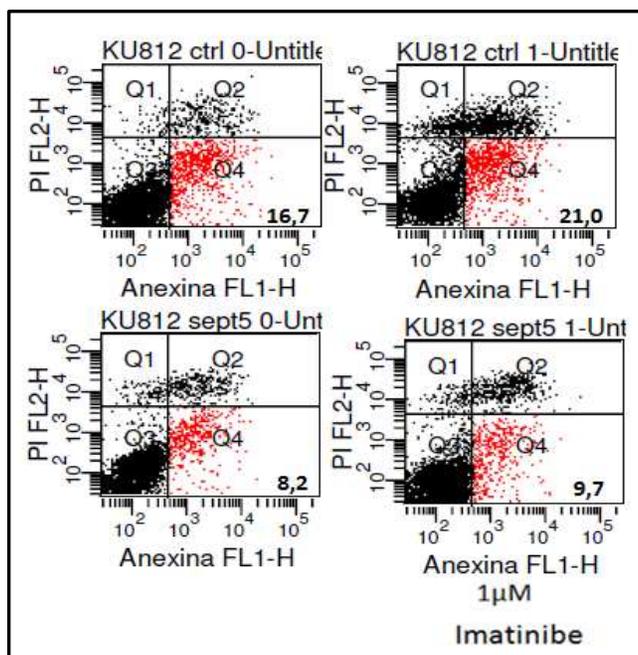


Figura 43: Atividade apoptótica verificada por citometria de fluxo em células KU812 shCTRL e shSEPT5 marcadas com Anexina V/PI.

Avaliação da apoptose celular pela atividade das caspases 3, 8 e 9

A avaliação do efeito do silenciamento dos genes em estudo sobre a apoptose das células também foi avaliada após incubá-las com FITC-DEVD-FMK, FITC-IETD-FMK e FITC-LEHD-FMK para mensuração da atividade das caspases 3, 8 e 9 respectivamente.

Em K562, na ausência de imatinibe houve diminuição significativa na atividade da caspase 3 em shTOB1. Células K562 shTOB1 tiveram diminuição significativa da atividade das caspases 3, 8 e 9 na presença de imatinibe.

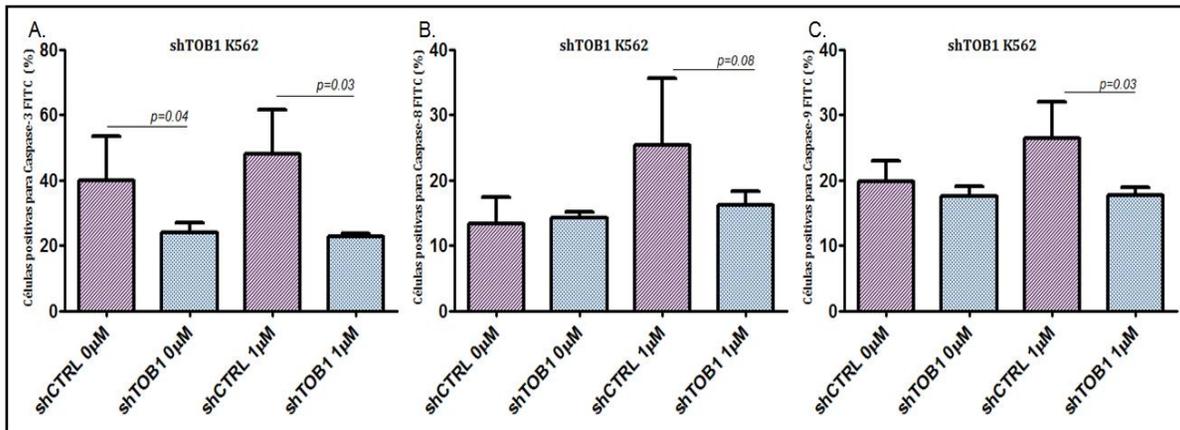


Figura 44. O silenciamento de *TOB1* diminui a atividade das caspases 3(A), 8(B) e 9(C) e tem efeito dose-resposta com o imatinibe. A atividade de caspases foi detectada por citometria de fluxo em células shControle e shTOB1 incubadas na ausência ou presença de imatinibe (0 e 1µM) por 48 horas. Foi considerado significativo $p \leq 0.05$, teste *t*, *Mann-Whitney*.

Em células NB4 o efeito do silenciamento de *TOB1* seguiu semelhante ao perfil encontrado em K562.

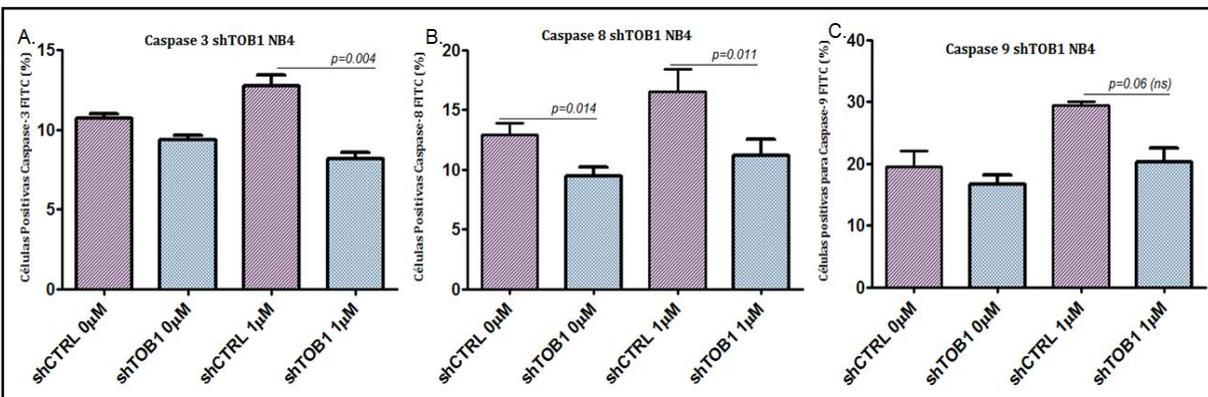


Figura 45. O silenciamento de *TOB1* em células NB4 diminui a atividade da caspase 3(A), caspase 8 (B) e na caspase 9 (C) em presença ou ausência de imatinibe. Foi considerado significativo $p \leq 0.05$, teste *t*, *Mann-Whitney*.

A inibição de *SEPT5* em K562 aumentou significativamente a atividade da caspase 3 (gráfico A) nas duas condições avaliadas, com $p=0.04$ e $p=0.05$. Na caspase 8 (gráfico B) e 9 (gráfico C) não foi observada alteração significativa da atividade das caspases entre shSEPT5 e shControles apesar de observar-se uma tendência a aumento nas diferentes condições e linhagens estudadas.

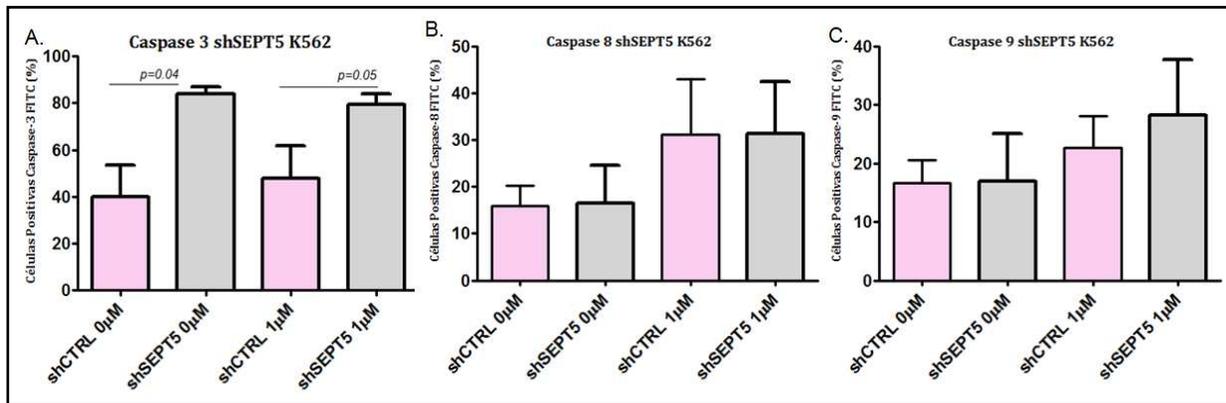


Figura 46: Avaliação do efeito do silenciamento de *SEPT5* na atividade das caspases 3, 8 e 9 em K562 na ausência ou presença de imatinibe (0 e 1µM). Foi considerado significativo $p \leq 0.05$, teste *t*, *Mann-Whitney*.

Para as linhagens NB4 (Figura 47) e KU812 (Figura 48) a inibição de *SEPT5* não acarretou em nenhuma alteração significativa na atividade das caspases 3, 8 e 9 em nenhuma das condições avaliadas.

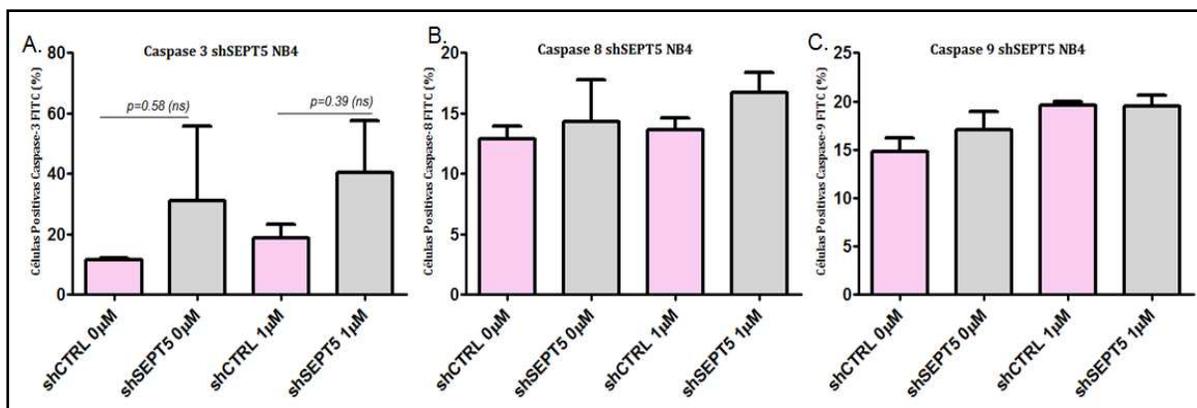


Figura 47: Avaliação do efeito do silenciamento de *SEPT5* na atividade das caspases 3, 8 e 9 em NB4. Foi considerado significativo $p \leq 0.05$, teste *t*, *Mann-Whitney*.

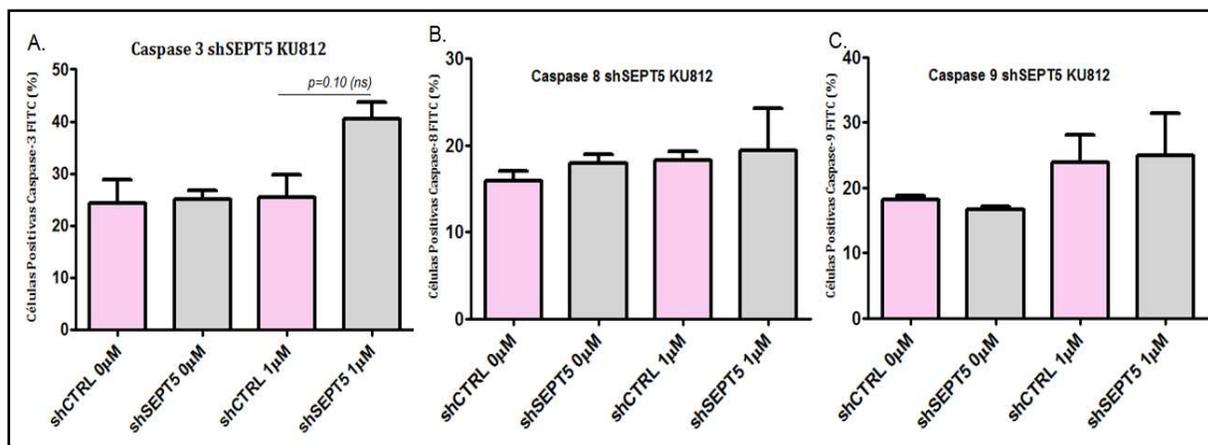


Figura 48: Avaliação do efeito do silenciamento de *SEPT5* na atividade das caspases 3, 8 e 9 em KU812. Foi considerado significativo $p \leq 0.05$, teste *t*, *Mann-Whitney*.

Avaliação do efeito do silenciamento de *TOB1*, em células K562, nas vias de sinalização mTOR/AKT E MAPK

Algumas importantes vias de sinalização têm sido descritas como ativadas por BCR-ABL, PI3K-Akt/mTOR e MAPK (Dearth, Cui et al. 2007). Dessa forma, o efeito do silenciamento do *TOB1* na ativação das vias PI3K-Akt/mTOR e Ras/MAPK foi avaliado em células K562, que são BCR-ABL positivas. A fosforilação de Akt foi aumentada nas células shTOB1, quando comparada às células shControle. Houve também diminuição na fosforilação de ERK1/2 nas células shTOB1 quando comparadas às células shControle (Figura 49). O aumento na fosforilação da proteína Akt e aumento da proteína P70S6K apesar da diminuição de ERK1/2 estão de acordo com os resultados observados nos experimentos funcionais, que evidenciaram aumento da proliferação celular nas células silenciadas para *TOB1*.

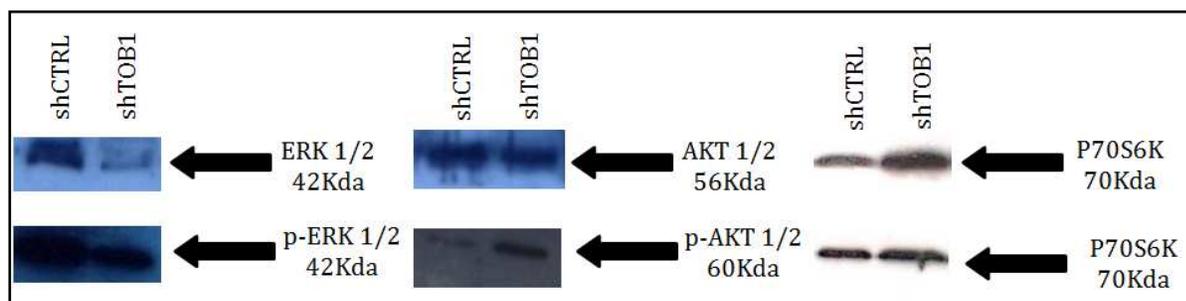


Figura 49: O silenciamento de *TOB1* diminui a fosforilação de ERK 1/2, aumentou a fosforilação de AKT 1/2 e de P70S6K em células K562. *Western blot* de extratos protéicos de células shControle e shTOB1 para avaliação da expressão de fosfo-Akt, fosfo-P70S6K e fosfo-ERK1/2; as membranas foram re-incubadas com o anticorpo para detecção da proteína total

respectiva.

Avaliação do efeito do silenciamento do *TOB1* nas vias de apoptose celular e CRKL

A expressão da proteína pró-apoptótica BAD e sua porção fosforilada (p-BAD) diminuiu em células submetidas à inibição de *TOB1* quando comparadas às células controles (Figura 50). Estes dados corroboram com os resultados obtidos nos ensaios funcionais, que evidenciaram diminuição da apoptose celular em células shTOB1.

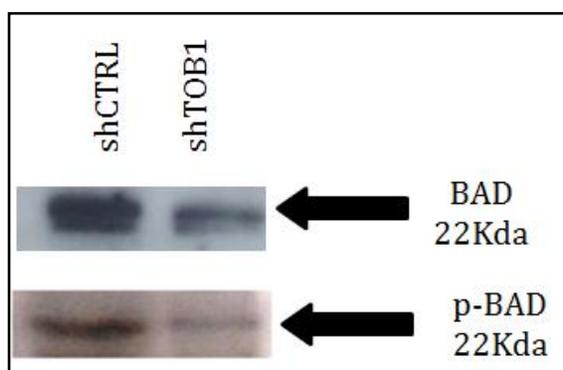


Figura 50: O silenciamento de *TOB1* diminuiu a expressão de BAD e pBAD em células K562. *Western blot* de extratos protéicos de células shControle e shTOB1 para avaliação da expressão de BAD e fosfo-BAD; as membranas foram re-incubadas com o anticorpo para detecção da proteína total respectiva.

Não foi observada modulação nos níveis de fosforilação da CRKL nas células shTOB1 quando comparadas com as células shControle.

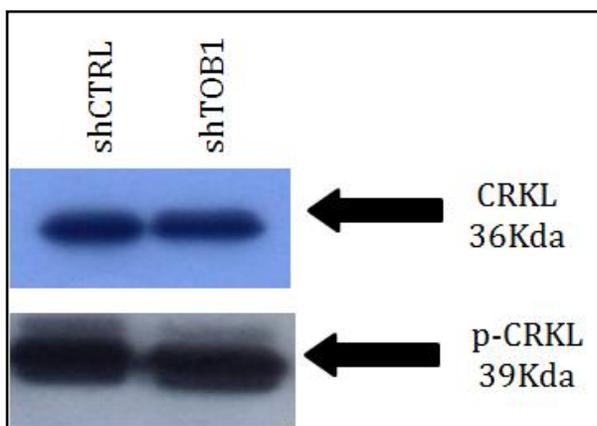


Figura 51: O silenciamento de *TOB1* não modula a fosforilação de CRKL em células K562.

Estudo da expressão dos genes *SEPT5* e *TOB1*

Como descrito no capítulo I o padrão de expressão desses genes foi determinado em células granulocíticas, uma vez que esta é a linhagem de maior proliferação na LMC, além do que, poucos estudos relacionados com LMC relatam sobre esse tipo celular. Também foi estudada a expressão dos genes em leucócitos totais, células mononucleares, medula óssea de indivíduos controle e de pacientes com LMC, linhagens celulares humanas e de murino. Também foi verificada, sumariamente, a diferença nos níveis de adesão celular entre granulócitos de controles e pacientes com LMC.

Expressão do gene *SEPT5*

Assim como no capítulo I, observa-se que a expressão do gene *SEPT5* é maior nas amostras de pacientes com LMC do que em amostras controles. Na Figura 52 pode ser observada a expressão dos grupos de células mononucleares, leucócitos totais e células da medula óssea de indivíduos controle e pacientes. Isso sugere que esta expressão poderia estar aumentada em todas as células humanas que possuem a translocação BCR-ABL.

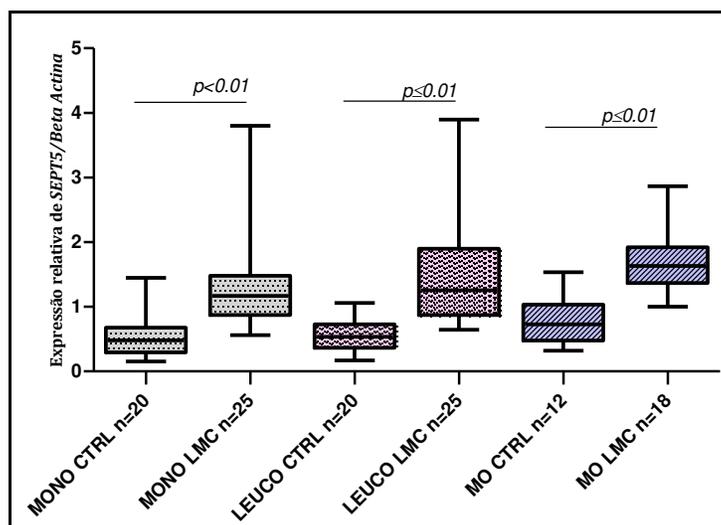


Figura 52: Expressão do gene *SEPT5* em células mononucleares (MONO), leucócitos totais (LEUCO) e medula óssea (MO) de indivíduos controle (CTRL) e pacientes com LMC avaliada por qPCR. As linhas horizontais representam a mediana. Foi considerado significativo $p \leq 0.05$, teste *t*, *Mann-Whitney*.

Em relação às linhagens celulares de murino BaF3^{wild type}, BaF3^{BCR-ABLp210} e BaF3^{T315I}, os resultados aqui descritos deixam evidente que a expressão do gene é maior em células translocadas portadoras da mutação T315I e menor nas células normais (BaF3^{wild type}).

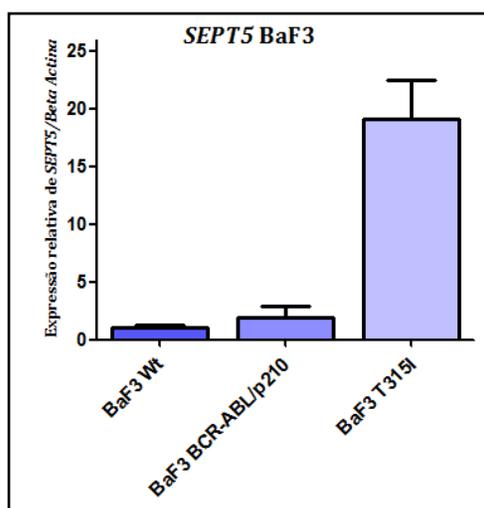


Figura 53: Análise da expressão do gene SEPT5 em linhagens celulares de murino.

Ao estudar as linhagens humanas, algumas das linhagens mielóides que mostraram expressão aumentada do gene são linhagens que possuem a translocação t(9;22) e estão relacionadas com a fase blástica da doença [K562, KU812, NALM] outras são linhagens presentes em leucemias agudas [HL60, P39, NB4]. Das linfóides, os maiores níveis de expressão foram de LLA T, B ou Burkitt (Figura 54). Esse resultado corrobora com os dados da literatura que mostram a presença desse gene ativo em neoplasias mielóides.

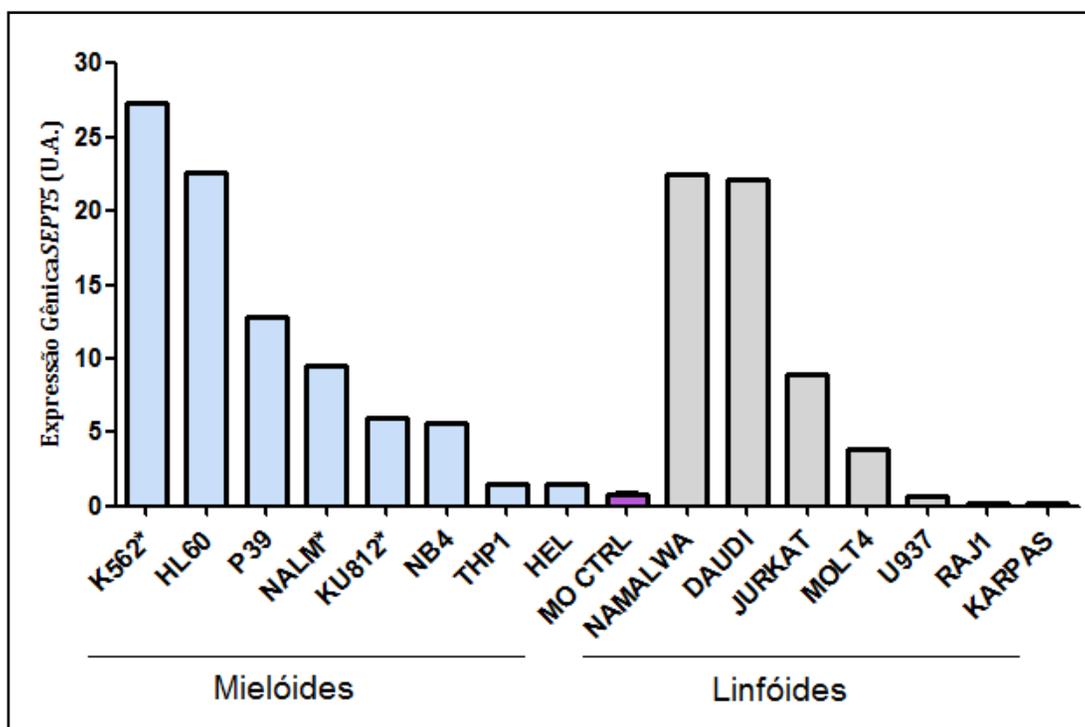


Figura 54. Expressão do RNAm do gene *SEPT5* em amostras de diferentes linhagens celulares linfóides, mielóides e de linfomas; além da expressão em medula óssea de indivíduos controle (MO). A linhagem K562 foi utilizada como amostra calibradora.

Caracterização da expressão do gene *TOB1*

Foi feita a caracterização da expressão do gene *TOB1* em células mononucleares, leucócitos totais, medula óssea de pacientes e controles, 15 linhagens celulares de humano e 3 linhagens de murino BaF3^{WT}, BaF3^{BCR-ABLp210wt} e BaF3^{T315I}. No capítulo I foi relatada a expressão em células granulocíticas.

Quando verificados os resultados obtidos nesses diferentes tipos celulares é possível afirmar que independente do tipo celular ou fase da doença este gene tem uma expressão menor em pacientes com LMC quando comparados a indivíduos saudáveis.

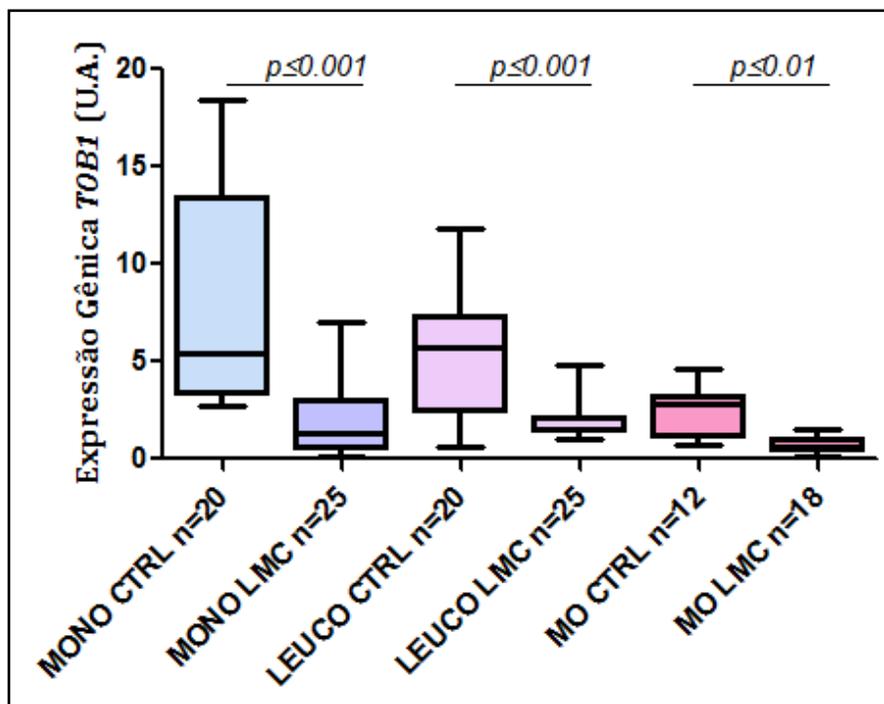


Figura 55. Expressão do gene *TOBI*, por qPCR, em células mononucleares (MONO), leucócitos totais (LEUCO) e medula óssea (MO) de indivíduos controle (CTRL) e pacientes com LMC. As linhas horizontais representam à mediana. Foi considerado significativo $p \leq 0.05$, teste *t*, *Mann-Whitney*.

Na avaliação de *TOBI* em linhagens celulares humanas encontrou-se uma expressão muito aumentada na linhagem celular NAMALWA que é proveniente de linfoma de Burkitt. Também é possível observar uma alta expressão em HL60, P39 e KARPAS, essas são linhagens de leucemia mieloide aguda, leucemia mielomonocítica (com características de síndrome mielodisplásica e de síndrome mieloproliferativa) e linhagem celular T, CD4+. Em células Ph⁺ como na K562, KU812 e NALM há diminuição da expressão (Figura 56).

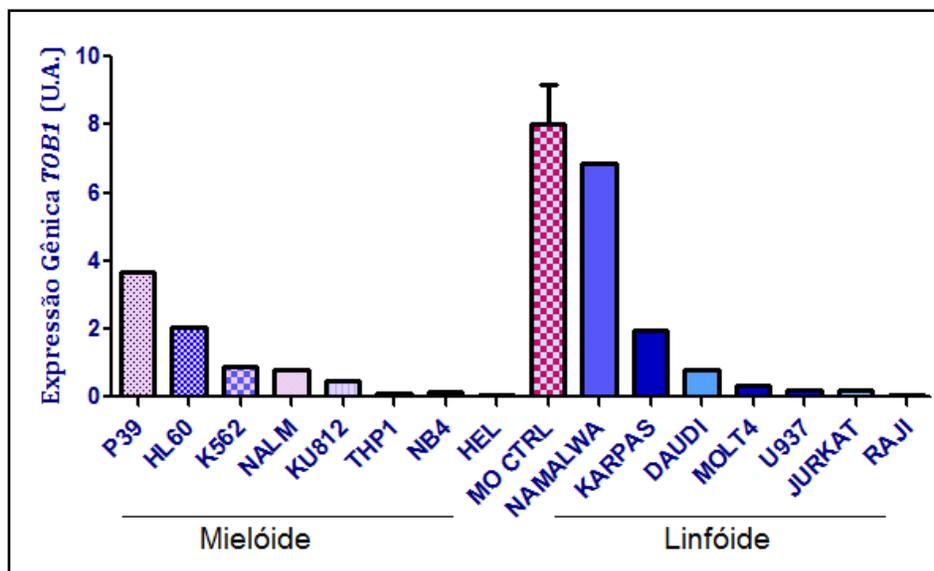


Figura 56. Expressão do RNAm do gene *TOBI* em amostras de diferentes linhagens celulares linfóides, mielóides e de linfomas, além da expressão em medula óssea de indivíduos controle (MO). A linhagem K562 foi utilizada como amostra calibradora.

Quando comparadas as linhagens de murino, a linhagem *wild type* mostra expressão maior do gene em relação às linhagens alteradas, esse dado vem corroborar com os ensaios feitos em células de pacientes e controles que mostram a expressão diminuída nos pacientes com LMC.

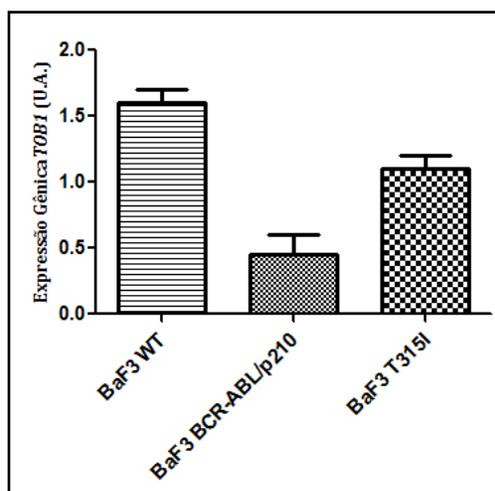


Figura 57. Análise da expressão do gene *TOBI* em linhagens celulares de murino.

Adesão de granulócitos de controles e indivíduos com LMC

Como foram encontradas alterações em vários genes que regulam a adesão celular foi feito um estudo superficial da adesão dos granulócitos de controles e pacientes. Apesar de preliminares, os resultados obtidos indicam uma diminuição nas propriedades adesivas de granulócitos de pacientes com LMC.

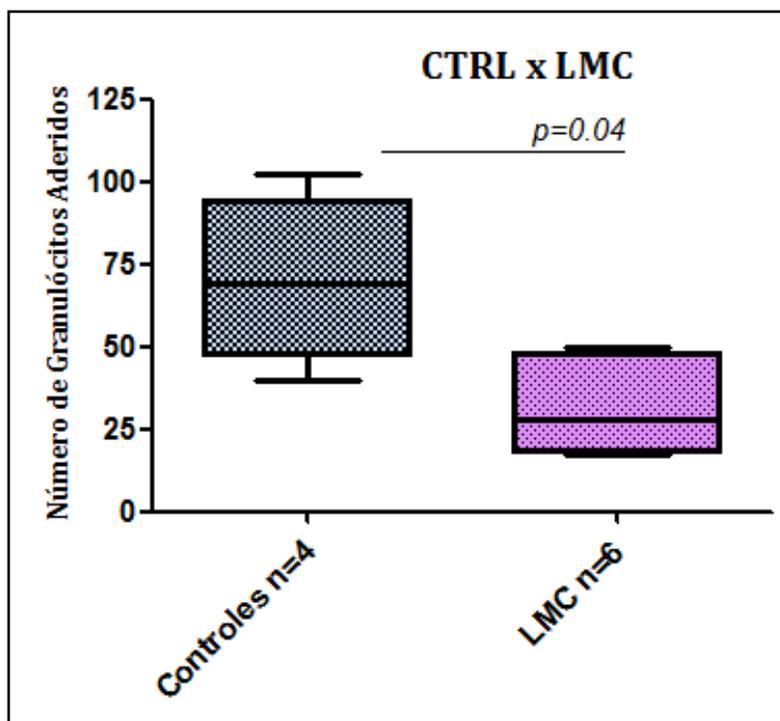


Figura 58: Adesão de granulócitos (5×10^6 cls/mL) à fibronectina ($20 \mu\text{g/mL}$) por 3 minutos, sob força de cisalhamento de $0,5 \text{ d/cm}^2$ e 37°C de indivíduos controle e indivíduos com LMC. O número de células aderidas foi determinado num campo de visão de $1600 \times 1200 \mu\text{m}^2$. Teste *t student*, foi considerado valor significativo $p \leq 0.05$.

Quando a análise foi feita levando em consideração as diferentes fases da doença foi possível notar que há diminuição significativa na adesão dessas células.

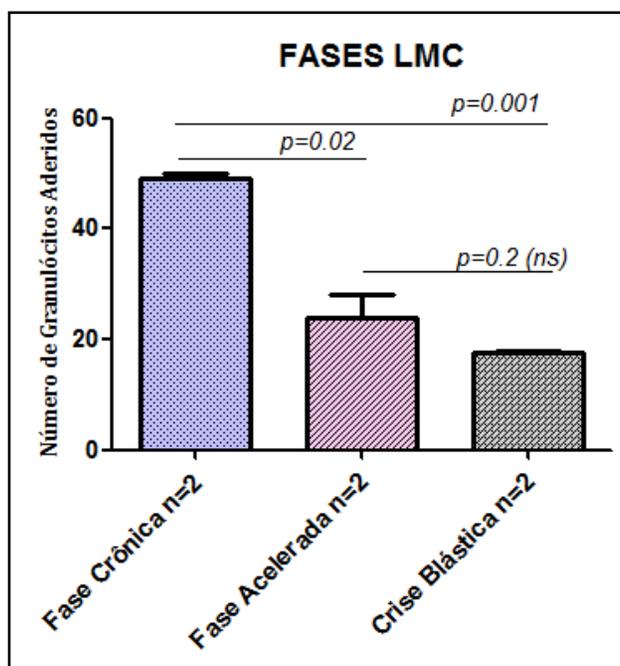


Figura 59. Adesão de granulócitos (5×10^6 cels/mL) à fibronectina ($20 \mu\text{g/mL}$) por 3 minutos, sob força de cisalhamento de $0,5 \text{ d/cm}^2$ e 37°C de indivíduos em tratamento com inibidores de tirosina quinase. O número de células aderidas foi determinado em um campo de visão de $1600 \times 1200 \mu\text{m}^2$.

Essa alteração nas propriedades adesivas dos granulócitos em pacientes com LMC pode estar diretamente ligada à liberação de células jovens pela matriz da medula óssea, entretanto os resultados aqui apresentados são preliminares.

Discussão

Em conjunto com os dados descritos no capítulo anterior, os resultados aqui apresentados mostraram um aumento significativo na expressão do gene *SEPT5* em todos os tipos celulares analisados em pacientes com LMC. O mesmo padrão foi observado nas linhagens BaF3 de murino, igualmente em células que possuem a $t(9;22)$ e estão relacionadas com a fase blástica da doença [K562, KU812, NALM]. Em relação à expressão do gene *TOB1* os resultados mostram diminuição em todos os tipos celulares analisados em pacientes com LMC e linhagens BaF3 (BCR-ABL/p210 e T315I). Assim, genes até então desconhecidos na LMC poderiam atuar sobre diferentes processos celulares e vias de sinalizações modificadas pelo BCR-ABL.

Embora o mecanismo oncogênico exato da proteína BCR-ABL seja desconhecido, estudos *in vitro* e em modelos animais mostraram que a atividade da proteína tirosina quinase por

si só é suficiente para causar o desenvolvimento da LMC. Esse processo se dá pela ativação de múltiplas vias de transdução de sinais que levam, entre outras, alterações na proliferação celular e redução da aderência de células leucêmicas ao estroma da medula óssea (Savage and Antman 2002; Goldman and Melo 2003).

A fusão das proteínas ABL e BCR forma uma oncoproteína que ativa diversas vias de sinalização como Myc, Ras, MAPK/ERK, NFkB, PI3K dentre outras. Muitas dessas proteínas agem sinalizando e interagindo com a BCR/ABL e os domínios funcionais SH1, SH2 e GRB2, modificando e fosforilando as proteínas relacionadas. Ou seja, o BCR/ABL pode regular de diferentes maneiras as vias de sinalização relacionadas, constituindo um fator importante no desenvolvimento e na modificação do curso da doença devido às alterações na cascata de sinalização, proliferação e transformação da LMC para as fases acelerada e crise blástica(Inokuchi 2006).

O *TOB1* e *SEPT5* poderiam ser ativados por diferentes vias, ou mesmo a ativação indireta, da via das septinas ou dos ERBB's, poderia desencadear a alteração dessas expressões. Uma possibilidade de ativação é por meio da via Ras, descrita dentre as vias ativadas pelo oncogene BCR/ABL capaz de ativar vias como SHC (*Src homology 2 domain containing*) e GRB2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) que por sua vez são capazes de ativar a via Ras, que está relacionada a sinalização de uma cascata de vias que desencadeiam a proliferação e transformação celular. A ativação de Ras é capaz de ativar Rho (*ras homolog gene family*), que é um membro da superfamília Ras de pequenas proteínas de ligação GTP, que possuem um papel central em diversos processos biológicos tais como transcrição de genes, transformação oncogênica e progressão do ciclo celular.(Deininger, Goldman et al. 2000)

Outra via que também pode desencadear a ativação de *TOB1* e *SEPT5* é a via que se inicia com o gene ERBB3 (*v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3*), que codifica um membro da família dos receptores de fatores de crescimento de epiderme dos receptores tirosina quinase, atuando na transmissão de sinais extracelulares para o citoplasma. Já foram descritas vias independentes do BCR/ABL que podem estar relacionadas ao desenvolvimento e progressão da doença, como o caso do ERBB3.

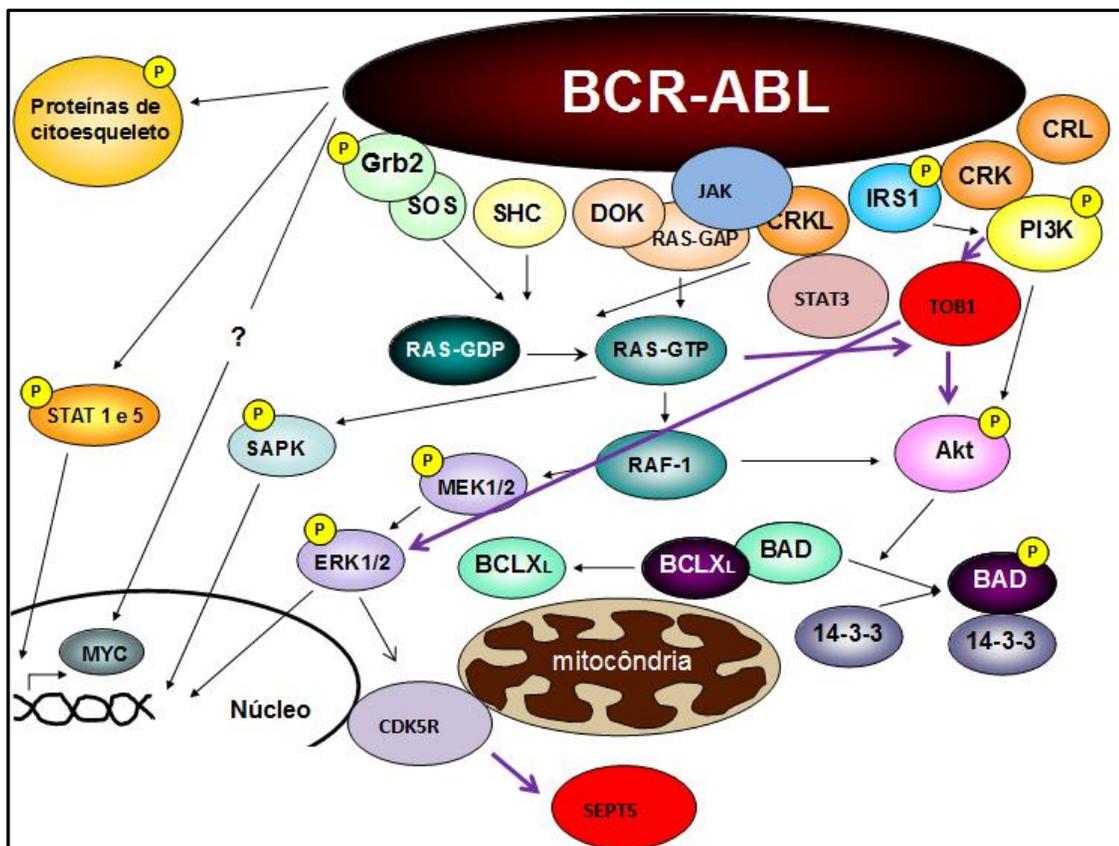


Figura 60: Representação esquemática das vias de sinalização por BCR-ABL. Possíveis caminhos para *TOB1* e *SEPT5*. Adaptado de Deininger *et al.*, 2000 e Kharas e Fruman, 2005.

Já a inibição da apoptose é resultante da ativação de PI3K e Ras com indução de AKT para MYC e BCL2 (Inokuchi 2006). A proteção contra a morte celular programada é mediada em parte pelo aumento da expressão da STAT-5 e consequentemente da molécula anti apoptótica BCL além da fosforilação e inativação da molécula pro apoptótica BAD pela AKT (Druker 2008).

A alteração da atividade de apoptose e avaliação do ciclo celular são efeitos a serem avaliados quando se inibe um gene. Entre os efeitos do silenciamento de *TOB1* está a diminuição da taxa apoptótica. Uma das importantes vias relacionadas a isto é a via PI3K/Akt, sua atuação mais estabelecida nas células BCR-ABL⁺ é a proliferação celular e regulação de moléculas pro apoptóticas BAD (Deininger, Goldman *et al.* 2000; Baran and Saydam 2012). PI3K/Akt tem sido descrita como um dos mecanismos de sinalização essenciais em leucemogênese do ABL, sendo os seus efetores responsáveis pela propagação de sinais que promovem a transformação mielóide e linfóide (Banerjee Mustafi, Chakraborty *et al.* 2010). No entanto, não é provável que essa

função por si só que seja suficiente para explicar a ativação frequente de Akt em cânceres humanos. Existem evidências de que Akt participe da proliferação, na transição normal da fase G₁ para fase S do ciclo celular e na transformação oncogênica, independentemente da sua função anti-apoptótica (Skeen, Bhaskar et al. 2006).

Foram encontradas alterações no que diz respeito ao ciclo celular após a inibição dos genes em estudo, e também podem ser citados os resultados referentes às caspases, que tiveram suas atividades diminuídas quando o gene *TOBI* foi inibido. Esse evento pode estar intimamente ligado ao fato de o gene ser um supressor tumoral que interage com receptores de tirosina quinase e atua na mesma via que a MAPK1 (Jiao, Sun et al. 2012). Esta proteína está envolvida na iniciação e regulação da mitose, meiose e funções pós mitóticas além de diferenciação celular e exerce um papel central na ligação de receptores de superfície celular levando a alterações transcricionais. A desfosforilação de MAPK1 é responsável pela determinação da magnitude e duração da ativação das proteínas quinases, então quando ocorre alteração nessa via o resultado é o aumento da sinalização, conseqüentemente há o aumento da atividade das proteínas quinases (Geest and Coffey 2009).

Assim, a alteração da expressão do gene *TOBI* e *SEPT5* parece ser devido à ativação de vias por diferentes fatores, incluindo vias relacionadas à própria ativação do oncogene BCR/ABL e vias independentes que podem estar ligadas a progressão da doença. Em conjunto, esses resultados indicam que a inibição de *TOBI* resulta no aumento da proliferação e clonogenicidade, diminuição da apoptose e alteração do ciclo celular, possivelmente através da ativação da fosforilação de algumas vias como Akt, P70S6K e ERK1/2. Pode-se sugerir que o acúmulo significativo de células na fase S, seguido por uma diminuição de células na fase G₂ do ciclo celular seja devido à inibição de outras vias, como por exemplo, a P70S6K e MAPK1, que regulam vários processos celulares, incluindo síntese protéica e alteração da fase G₁ para a fase S do ciclo celular (de Groot, Ballou et al. 1994; Ferrari and Thomas 1994).

Nesse contexto, o silenciamento gênico chama atenção para as possibilidades de controle molecular da proliferação celular, apoptose, ciclo celular e clonogenicidade em células *BCR-ABL* positivas visando outras proteínas, além da *BCR-ABL*, como alvo. Sendo esta, uma estratégia necessária em casos de LMC resistentes ao tratamento com inibidores de tirosina quinase ou em progressão da doença.

É interessante ressaltar as implicações da alteração da adesão celular encontrada em granulócitos de pacientes com LMC. Os dados demonstraram a diminuição da adesão celular em granulócitos de LMC, com uma tendência de diminuição nas fases acelerada e crise blástica. Essa alteração nas propriedades adesivas dos granulócitos em pacientes com LMC pode estar relacionada à liberação de células jovens pela matriz da medula óssea. Possivelmente os inibidores de tirosina quinase disponíveis para tratamento dessa doença interagem com as moléculas adesivas desencadeando mecanismos que permitam que esse tipo celular mantenha sua capacidade adesiva semelhante a normal.

Em estado normal o recrutamento de leucócitos na circulação é iniciado por sua captura e, em seguida, rolamento ao longo das vênulas pós-capilares nos leitos vasculares periféricos. Isso é mediado primeiramente pelas selectinas, que intermediam interações de leucócitos com o endotélio (Issekutz 1998; Hidalgo, Peired et al. 2007). A L-selectina é expressa na ponta das microvilosidades dos leucócitos e está envolvida na adesão de leucócitos ao endotélio *in vivo* e *in vitro* (Tarrant and Patel 2006; Hidalgo, Peired et al. 2007; Ley, Ekman et al. 2007), se levadas em consideração as alterações que ocorrem na LMC podem ser observadas alterações celulares, e com isso as alterações de expressão de moléculas como as interleucinas e integrinas, mimetizando um estado de inflamação intravascular que dificulta a adesão das células.

Após o rolamento inicial dos leucócitos, as quimiocinas, secretadas por células dos tecidos e imobilizadas na superfície endotelial, ativam moléculas da família das integrinas nas células circulantes, levando a uma adesão firme dos leucócitos com o intuito de resistir ao descolamento provocado pelo fluxo sanguíneo (Alon and Feigelson 2002; Long, Mitchell et al. 2004). O aumento do número de células jovens na corrente sanguínea devido à liberação dessas células pela medula óssea tem grande importância na progressão da LMC, e ao voltar nos resultados do capítulo I observa-se que uma das vias que estão fazendo a regulação gênica na biblioteca de indivíduos controle é a via da IL-4. Estudos mostram que as citocinas e quimiocinas como IL-4, IL-8, GM-CSF e TNF- α podem aumentar a afinidade das integrinas na superfície dos neutrófilos, aumentando as suas propriedades adesivas (Hynes 2002; Assis, Conran et al. 2005; Lefort, Hyun et al. 2009; Miguel, Dominical et al. em submissão) em contrapartida, na LMC em fases avançadas a produção aumentada de células leva a consequente alteração dessas substâncias.

Em conclusão, o presente estudo apresenta a primeira descrição da participação direta do supressor de tumor *TOBI* e do gene *SEPT5* na regulação das vias metabólicas da LMC. Isso pode representar novas vias celulares de ativação e controle do *BCR-ABL*. Também foi apresentado aqui o gene *TOBI* como um possível alvo terapêutico ou marcador de prognóstico na LMC.

6. Conclusão

Apresentou-se nesta tese um estudo de alguns genes, expressos de maneira diferente entre indivíduos com LMC e controles, na tentativa de explicar a ausência do efeito esperado dos inibidores de tirosina quinase e a progressão da doença. Às escuras, partindo-se de uma técnica pouco utilizada na literatura e vários questionamentos sobre a doença, um conjunto de genes anteriormente destacados na literatura foi estudado. Ao tecer uma colcha de métodos de biologia molecular e celular, o trabalho promoveu uma investigação em busca da diferença de atuação de tais genes em relação aos controles.

O ponto mais relevante dessa tese é a busca por um novo marcador prognóstico nessa doença tão complexa e com tantos mecanismos a serem explorados. Alguns desses genes foram pela primeira vez associados à LMC, o que mostra o potencial desse conjunto de métodos e análises em gerar resultados profícuos.

Das análises apresentadas, pode-se concluir que :

1. Ao fazer o estudo da expressão gênica diferencial foram encontrados vários genes com expressão diferente em pacientes com LMC e controles saudáveis. Foi observada a presença de genes regulando de formas diferentes as vias de sinalização em células saudáveis e células de LMC.
2. Alguns genes encontrados no estudo da expressão gênica diferencial foram pela primeira vez associados à LMC.
3. Dentre os genes encontrados na *SSH* alguns pareciam promissores. Entre eles, o *TOBI* foi avaliado em um número grande de pacientes e relacionado com a resposta ao uso de inibidores de tirosina quinase.
4. O silenciamento de *TOBI* interfere na proliferação celular, clonogenicidade, apoptose, ciclo celular e expressão de proteínas importantes da cascata de sinalização, o que salienta sua importância em células BCR-ABI positivas.
5. O gene *SEPT5* ao ser silenciado leva a algumas alterações como a apoptose e ciclo celular. Porém, esse gene que parecia interessante para essa doença, não atendeu as expectativas em sua correlação com a LMC.
6. Na Medula óssea, nos leucócitos totais e nas células mononucleares os genes estudados seguem com o mesmo perfil de expressão do encontrado em granulócitos. Portanto, independente da maturidade, composição ou função celular a expressão do gene segue o mesmo padrão.

7. Em linhagens celulares o perfil de expressão dos genes é diferente em linhagens linfóides e mielóides.
8. A alteração nas propriedades adesivas dos granulócitos em pacientes com LMC pode estar relacionada à liberação de células jovens pela matriz da medula óssea, existindo uma tendência a diminuição da adesão em fases avançadas da doença.

A tessitura dos resultados permite que sejam traçadas algumas inferências e hipóteses sobre a intimidade do gene *TOBI* e a LMC, entretanto, uma análise mais detalhada é necessária, sendo importante os estudos *in vivo*.

Por fim, destaca-se a importância de se promover essa investigação na busca de tratamentos alternativos para pacientes que tem progressão de doença ou não respondem aos tratamentos disponíveis no atual estado da arte, esse ponto é de extrema relevância, por vislumbrar o aumento da sobrevida e qualidade de vida desses doentes.

7. Referências Bibliográficas

- Albensi, B. C. and M. P. Mattson (2000). "Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity." *Synapse* 35(2): 151-159.
- Alon, R. and S. Feigelson (2002). "From rolling to arrest on blood vessels: leukocyte tap dancing on endothelial integrin ligands and chemokines at sub-second contacts." *Semin Immunol* 14(2): 93-104.
- Assis, A., N. Conran, et al. (2005). "Effect of cytokines and chemokines on sickle neutrophil adhesion to fibronectin." *Acta Haematol* 113(2): 130-136.
- Baccarani, M., F. Castagnetti, et al. (2009). "Response definitions and European Leukemianet Management recommendations." *Best Pract Res Clin Haematol* 22(3): 331-341.
- Baetta, R. and A. Corsini (2010). "Role of polymorphonuclear neutrophils in atherosclerosis: current state and future perspectives." *Atherosclerosis* 210(1): 1-13.
- Bai, Y., C. Yang, et al. (2004). "Itch E3 ligase-mediated regulation of TGF-beta signaling by modulating smad2 phosphorylation." *Mol Cell* 15(5): 825-831.
- Banerjee Mustafi, S., P. K. Chakraborty, et al. (2010). "Modulation of Akt and ERK1/2 pathways by resveratrol in chronic myelogenous leukemia (CML) cells results in the downregulation of Hsp70." *PLoS One* 5(1): e8719.
- Baran, Y. and G. Saydam (2012). "Cumulative clinical experience from a decade of use: imatinib as first-line treatment of chronic myeloid leukemia." *J Blood Med* 3: 139-150.
- Bidere, N., V. N. Ngo, et al. (2009). "Casein kinase 1alpha governs antigen-receptor-induced NF-kappaB activation and human lymphoma cell survival." *Nature* 458(7234): 92-96.
- Blackmore, T. M., C. F. Mercer, et al. (2008). "The transcriptional cofactor MIER1-beta negatively regulates histone acetyltransferase activity of the CREB-binding protein." *BMC Res Notes* 1: 68.
- Branford, S., D. W. Kim, et al. (2012). "Initial molecular response at 3 months may predict both response and event-free survival at 24 months in imatinib-resistant or -intolerant patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia in chronic phase treated with nilotinib." *J Clin Oncol* 30(35): 4323-4329.
- Brauer, K. M., D. Werth, et al. (2007). "BCR-ABL activity is critical for the immunogenicity of chronic myelogenous leukemia cells." *Cancer Res* 67(11): 5489-5497.
- Canalli, A. A., F. F. Costa, et al. (2005). "Granulocytic adhesive interactions and their role in sickle cell vaso-occlusion." *Hematology* 10(5): 419-425.

- Cascao, R., R. A. Moura, et al. (2010). "Identification of a cytokine network sustaining neutrophil and Th17 activation in untreated early rheumatoid arthritis." *Arthritis Res Ther* 12(5): R196.
- Cerveira, N., S. Bizarro, et al. (2011). "MLL-SEPTIN gene fusions in hematological malignancies." *Biol Chem* 392(8-9): 713-724.
- Che, J., Y. W. Lu, et al. (2013). "Overexpression of TOB1 confers radioprotection to bronchial epithelial cells through the MAPK/ERK pathway." *Oncol Rep* 30(2): 637-642.
- Daver, N., P. Strati, et al. (2013). "FLT3 mutations in myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia." *Am J Hematol* 88(1): 56-59.
- de Groot, R. P., L. M. Ballou, et al. (1994). "Positive regulation of the cAMP-responsive activator CREM by the p70 S6 kinase: an alternative route to mitogen-induced gene expression." *Cell* 79(1): 81-91.
- Dearth, R. K., X. Cui, et al. (2007). "Oncogenic transformation by the signaling adaptor proteins insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2." *Cell Cycle* 6(6): 705-713.
- Deininger, M. W. (2008). "Chronic myeloid leukemia: an historical perspective." *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 418.
- Deininger, M. W., J. M. Goldman, et al. (2000). "The molecular biology of chronic myeloid leukemia." *Blood* 96(10): 3343-3356.
- Diatchenko, L., Y. F. Lau, et al. (1996). "Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(12): 6025-6030.
- Diatchenko, L., S. Lukyanov, et al. (1999). "Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes." *Methods Enzymol* 303: 349-380.
- Druker, B. J. (2008). "Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML." *Blood* 112(13): 4808-4817.
- Druker, B. J., S. G. O'Brien, et al. (2002). "Chronic myelogenous leukemia." *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 111-135.
- Druker, B. J., C. L. Sawyers, et al. (2001). "Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome." *N Engl J Med* 344(14): 1038-1042.
- Dunbar, A. J., L. P. Gondek, et al. (2008). "250K single nucleotide polymorphism array karyotyping identifies acquired uniparental disomy and homozygous mutations, including

- novel missense substitutions of c-Cbl, in myeloid malignancies." *Cancer Res* 68(24): 10349-10357.
- Ewing, B., L. Hillier, et al. (1998). "Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment." *Genome Res* 8(3): 175-185.
- Ezzeddine, N., T. C. Chang, et al. (2007). "Human TOB, an antiproliferative transcription factor, is a poly(A)-binding protein-dependent positive regulator of cytoplasmic mRNA deadenylation." *Mol Cell Biol* 27(22): 7791-7801.
- Ferrari, S. and G. Thomas (1994). "S6 phosphorylation and the p70s6k/p85s6k." *Crit Rev Biochem Mol Biol* 29(6): 385-413.
- Forrest, D. L., X. Jiang, et al. (2008). "An approach to the management of chronic myeloid leukemia in British Columbia." *Curr Oncol* 15(2): 90-97.
- Frazer, R., A. E. Irvine, et al. (2007). "Chronic Myeloid Leukaemia in The 21st Century." *Ulster Med J* 76(1): 8-17.
- Geest, C. R. and P. J. Coffey (2009). "MAPK signaling pathways in the regulation of hematopoiesis." *J Leukoc Biol* 86(2): 237-250.
- Ghosh, S., S. Zang, et al. (2011). "Global gene expression and Ingenuity biological functions analysis on PCBs 153 and 138 induced human PBMC in vitro reveals differential mode(s) of action in developing toxicities." *Environ Int* 37(5): 838-857.
- Gilliland, D. G. and M. S. Tallman (2002). "Focus on acute leukemias." *Cancer Cell* 1(5): 417-420.
- Goldman, J. M. and J. V. Melo (2003). "Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment." *N Engl J Med* 349(15): 1451-1464.
- Hahn, S. (2004). "Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery." *Nat Struct Mol Biol* 11(5): 394-403.
- Hamerschlak, N. (2008). "Leukemia: genetics and prognostic factors." *J Pediatr (Rio J)* 84(4 Suppl): S52-57.
- Henrique, R., A. S. Luis, et al. (2012). "The epigenetics of renal cell tumors: from biology to biomarkers." *Front Genet* 3: 94.
- Hidalgo, A., A. J. Peired, et al. (2007). "Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44." *Immunity* 26(4): 477-489.

- Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." *Cell* 110(6): 673-687.
- Ichikawa, M., T. Asai, et al. (2004). "AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis." *Nat Med* 10(3): 299-304.
- Inokuchi, K. (2006). "Chronic myelogenous leukemia: from molecular biology to clinical aspects and novel targeted therapies." *J Nippon Med Sch* 73(4): 178-192.
- Issekutz, A. C. (1998). "Adhesion molecules mediating neutrophil migration to arthritis in vivo and across endothelium and connective tissue barriers in vitro." *Inflamm Res* 47 Suppl 3: S123-132.
- Jamieson, C. H. (2008). "Chronic myeloid leukemia stem cells." *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 436-442.
- Jiao, Y., K. K. Sun, et al. (2012). "Suppression of human lung cancer cell proliferation and metastasis in vitro by the transducer of ErbB-2.1 (TOB1)." *Acta Pharmacol Sin* 33(2): 250-260.
- Kantarjian, H., J. V. Melo, et al. (2000). "Chronic Myelogenous Leukemia: Disease Biology and Current and Future Therapeutic Strategies." *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 90-109.
- Kantarjian, H., C. Sawyers, et al. (2002). "Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia." *N Engl J Med* 346(9): 645-652.
- Kantarjian, H. M., M. Talpaz, et al. (2006). "New insights into the pathophysiology of chronic myeloid leukemia and imatinib resistance." *Ann Intern Med* 145(12): 913-923.
- Kharas, M. G. and D. A. Fruman (2005). "ABL oncogenes and phosphoinositide 3-kinase: mechanism of activation and downstream effectors." *Cancer Res* 65(6): 2047-2053.
- Kim, S. H., S. Y. Chun, et al. (2008). "Interferon-alpha enhances artemisinin-induced differentiation of HL-60 leukemia cells via a PKCalpha/ERK pathway." *Eur J Pharmacol*.
- Kohler, M., C. Speck, et al. (1999). "Evidence for distinct substrate specificities of importin alpha family members in nuclear protein import." *Mol Cell Biol* 19(11): 7782-7791.
- Koretzky, G. A. (2007). "The legacy of the Philadelphia chromosome." *J Clin Invest* 117(8): 2030-2032.

- Kornblau, S. M., M. Womble, et al. (2006). "Simultaneous activation of multiple signal transduction pathways confers poor prognosis in acute myelogenous leukemia." *Blood* 108(7): 2358-2365.
- Kralj, E., S. Zakelj, et al. (2013). "Monitoring of imatinib targeted delivery in human leukocytes." *Eur J Pharm Sci*.
- Kroschinsky, F. P., U. Schakel, et al. (2008). "Cup-like acute myeloid leukemia: new disease or artificial phenomenon?" *Haematologica* 93(2): 283-286.
- Kundu, J., S. M. Wahab, et al. (2012). "Tob1 induces apoptosis and inhibits proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells by activating Smad4 and inhibiting betacatenin signaling." *Int J Oncol* 41(3): 839-848.
- Lange, T., T. Ernst, et al. (2012). "The quantitative level of T315I mutated BCR-ABL predicts for major molecular response to second line nilotinib or dasatinib treatment in patients with chronic myeloid leukemia." *Haematologica*.
- Lefort, C. T., Y. M. Hyun, et al. (2009). "Outside-in signal transmission by conformational changes in integrin Mac-1." *J Immunol* 183(10): 6460-6468.
- Ley, C., S. Ekman, et al. (2007). "Interleukin-6 and tumour necrosis factor in synovial fluid from horses with carpal joint pathology." *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 54(7): 346-351.
- Li, F. and G. Sethi (2010). "Targeting transcription factor NF-kappaB to overcome chemoresistance and radioresistance in cancer therapy." *Biochim Biophys Acta* 1805(2): 167-180.
- Long, A., S. Mitchell, et al. (2004). "A multidisciplinary approach to the study of T cell migration." *Ann N Y Acad Sci* 1028: 313-319.
- Luatti, S., F. Castagnetti, et al. (2012). "Additional chromosomal abnormalities in Philadelphia-positive clone: adverse prognostic influence on frontline imatinib therapy: a GIMEMA Working Party on CML analysis." *Blood* 120(4): 761-767.
- Lugo, T. G., A. M. Pendergast, et al. (1990). "Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products." *Science* 247(4946): 1079-1082.
- McFarland, K. L. and G. A. Wetzstein (2009). "Chronic myeloid leukemia therapy: focus on second-generation tyrosine kinase inhibitors." *Cancer Control* 16(2): 132-140.
- Melo, J. V., T. P. Hughes, et al. (2003). "Chronic myeloid leukemia." *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 132-152.

- Miguel, L. I., V. M. Dominical, et al. (em submissão). "Inhibition of Phosphodiesterase 9A (PDE9A) Reduces Cytokine-Stimulated in vitro Adhesion of Neutrophils from Sickle Cell Anemia Individuals."
- Mittal, V. (2004). "Improving the efficiency of RNA interference in mammals." *Nat Rev Genet* 5(5): 355-365.
- Murati, A., M. Brecqueville, et al. (2012). "Myeloid malignancies: mutations, models and management." *BMC Cancer* 12: 304.
- Naka, K., T. Hoshii, et al. (2010). "TGF-beta-FOXO signalling maintains leukaemia-initiating cells in chronic myeloid leukaemia." *Nature* 463(7281): 676-680.
- Ohsaka, A., S. Shiina, et al. (2002). "Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia expressing p190(BCR-ABL)." *Intern Med* 41(12): 1183-1187.
- Panigrahi, S., J. Stetefeld, et al. (2012). "Modeling of Molecular Interaction between Apoptin, BCR-Abl and CrkL - An Alternative Approach to Conventional Rational Drug Design." *PLoS One* 7(1): e28395.
- Park, S., Y. Koh, et al. (2013). "Application of array comparative genomic hybridization in chronic myeloid leukemia." *Methods Mol Biol* 973: 55-68.
- Pezzolesi, M. G., K. M. Zbuk, et al. (2007). "Comparative genomic and functional analyses reveal a novel cis-acting PTEN regulatory element as a highly conserved functional E-box motif deleted in Cowden syndrome." *Hum Mol Genet* 16(9): 1058-1071.
- Polampalli, S., A. Choughule, et al. (2008). "Analysis and comparison of clinicohematological parameters and molecular and cytogenetic response of two Bcr/Abl fusion transcripts." *Genet Mol Res* 7(4): 1138-1149.
- Quintas-Cardama, A. and J. E. Cortes (2006). "Chronic myeloid leukemia: diagnosis and treatment." *Mayo Clin Proc* 81(7): 973-988.
- Radich, J. P., H. Dai, et al. (2006). "Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(8): 2794-2799.
- Rensing Rix, L. L., U. Rix, et al. (2009). "Global target profile of the kinase inhibitor bosutinib in primary chronic myeloid leukemia cells." *Leukemia* 23(3): 477-485.
- Reuter, C. W., M. A. Morgan, et al. (2000). "Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies?" *Blood* 96(5): 1655-1669.

- Rowlings, P. A., M. M. Horowitz, et al. (1992). "Report from the International Bone Marrow Transplant Registry." *Clin Transpl*: 83-90.
- Savage, D. G. and K. H. Antman (2002). "Imatinib mesylate--a new oral targeted therapy." *N Engl J Med* 346(9): 683-693.
- Schmidt, S., G. Gastl, et al. (2008). "Possible role for gene expression profiling in predicting responses to conventional or targeted drugs in patients with chronic myeloid leukemia." *Leuk Lymphoma* 49(4): 643-647.
- Sessions, J. (2007). "Chronic myeloid leukemia in 2007." *J Manag Care Pharm* 13(8 Suppl A): 4-7.
- Simanovsky, M., S. Berlinsky, et al. (2008). "Phenotypic and gene expression diversity of malignant cells in human blast crisis chronic myeloid leukemia." *Differentiation*.
- Simanovsky, M., S. Berlinsky, et al. (2008). "Phenotypic and gene expression diversity of malignant cells in human blast crisis chronic myeloid leukemia." *Differentiation* 76(8): 908-922.
- Skeen, J. E., P. T. Bhaskar, et al. (2006). "Akt deficiency impairs normal cell proliferation and suppresses oncogenesis in a p53-independent and mTORC1-dependent manner." *Cancer Cell* 10(4): 269-280.
- Steelman, L. S., S. C. Pohnert, et al. (2004). "JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis." *Leukemia* 18(2): 189-218.
- Stein, S. J. and A. S. Baldwin (2011). "NF-kappaB suppresses ROS levels in BCR-ABL(+) cells to prevent activation of JNK and cell death." *Oncogene* 30(45): 4557-4566.
- Sun, K. K., N. Zhong, et al. (2013). "Enhanced radiosensitivity of NSCLC cells by transducer of erbB2.1 (TOB1) through modulation of the MAPK/ERK pathway." *Oncol Rep* 29(6): 2385-2391.
- Tarrant, T. K. and D. D. Patel (2006). "Chemokines and leukocyte trafficking in rheumatoid arthritis." *Pathophysiology* 13(1): 1-14.
- Tavor, S., D. J. Park, et al. (2003). "Restoration of C/EBPalpha expression in a BCR-ABL+ cell line induces terminal granulocytic differentiation." *J Biol Chem* 278(52): 52651-52659.
- Tefferi, A. and J. W. Vardiman (2008). "Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms." *Leukemia* 22(1): 14-22.

- Tipping, A. J., M. W. Deininger, et al. (2003). "Comparative gene expression profile of chronic myeloid leukemia cells innately resistant to imatinib mesylate." *Exp Hematol* 31(11): 1073-1080.
- Tuschl, T. and A. Borkhardt (2002). "Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy." *Mol Interv* 2(3): 158-167.
- Tzachanis, D., G. J. Freeman, et al. (2001). "Tob is a negative regulator of activation that is expressed in anergic and quiescent T cells." *Nat Immunol* 2(12): 1174-1182.
- Valencia, A., J. Cervera, et al. (2009). "Complex Variant t(9;22) Chromosome Translocations in Five Cases of Chronic Myeloid Leukemia." *Adv Hematol* 2009: 187125.
- Zhao, L. J., Y. Y. Wang, et al. (2012). "Functional features of RUNX1 mutants in acute transformation of chronic myeloid leukemia and their contribution to inducing murine full-blown leukemia." *Blood* 119(12): 2873-2882.
- Zheng, C., L. Li, et al. (2006). "Gene expression profiling of CD34+ cells identifies a molecular signature of chronic myeloid leukemia blast crisis." *Leukemia* 20(6): 1028-1034.

8. Anexos

Anexo I – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FCM/UNICAMP



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 04/12/09.
(Grupo III)

PARECER CEP: N° 894/2009 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0690.0.146.000-09

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ANÁLISE FUNCIONAL DOS GENES SEPT5, TOB1 E PAN3 EM CULTURA DE LINHAGENS CELULARES BaF3, BaF3T3151 E LINHAGEM GRANULOCÍTICA DE PACIENTES PORTADORES DE LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Cíntia do Couto Mascarenhas.

INSTITUIÇÃO: Hemocentro/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 01/10/2009

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 04/12/10 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Explorar a expressão dos genes SEPT5, TOB1 e PAN3 (que, em granulócitos derivados de células progenitoras CD34+, apresentam expressão alterada em pacientes portadores de Leucemia Mielóide Crônica) com a expressão desses mesmos genes em linhagens de células BaF3 (células progenitoras da medula óssea 'doentes', isto é, portadoras do mesmo cromossomo 'Philadelphia', associado a LMC), cultivadas *in vitro* através do estímulo com IL-3. Será também explorado a expressão desses mesmos genes em células BaF3T3151, também cultivadas *in vitro*, mas cujo gene 'Philadelphia' é portador de uma mutação específica cuja expressão induz ao desenvolvimento de uma forma de LMC mais grave, que é insensível aos inibidores de tirosina quinase usados no controle dessa doença.

III - SUMÁRIO

Tese de Doutorado. A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é uma forma de leucemia que envolve o surgimento de um cromossomo 'anormal' denominado 'cromossomo Philadelphia', formado pela translocação recíproca de parte do conteúdo do cromossomo 9 com o cromossomo 22, e que pela fusão do gene 'ABL' do cromossomo 9 com o gene 'BCR' do cromossomo 22 resulta no gene híbrido 'BCR-ABL'. A expressão desse gene híbrido se encontra relacionada a uma proteína com uma alta atividade tirosina quinase, que é um estimulador celular associado a manifestação dessa doença. Apesar do controle da LMC se dar através de drogas inibidoras de tirosina quinase, esse controle é tão mais problemático a medida que haja mutações no gene híbrido que pioram a resposta às drogas inibidoras de tirosina quinase. Em particular, a mutação T3151 nesse gene é uma mutação que torna essa forma de leucemia não-responsiva às drogas inibidoras de tirosina quinase. O trabalho envolve a comparação da expressão de alguns genes cuja expressão alterada foi recentemente constatada em pacientes com LMC (SEPT5, TOB1 e PAN3) com a expressão desses mesmos genes em linhagens de células imaturas BaF3, portadoras do mesmo 'cromossomo Philadelphia', mas que por sua vez são cultivadas *in vitro*. Deverá ser investigado também a expressão desses genes em linhagens de células BaF3 portadoras da mutação T3151, também cultivadas *in vitro*.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII- DATA DA REUNIÃO

Homologado na X Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 27 de outubro de 2009.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
VICE PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM/UNICAMP

Anexo II – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Resolução CNS 196/96; 340/04; 347/05)

Pesquisa: ANÁLISE FUNCIONAL DOS GENES *SEPT5*, *TOB1* e *PAN3* EM CULTURA DE LINHAGENS CELULARES BaF3, BaF3^{T3151} E LINHAGEM GRANULOCÍTICA DE PACIENTES PORTADORES DE LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA.

Pesquisadores: Cintia do Couto Mascarenhas, Dra. Katia Borgia Barbosa Pagnano, Prof. Dr. Carmino Antônio de Souza

Local: HEMOCENTRO / FCM - UNICAMP

A finalidade deste projeto é trazer informações para o paciente sobre o estudo “Análise Funcional Dos Genes *SEPT5*, *TOB1* E *PAN3* Em Cultura De Linhagens Celulares Baf3, Baf3^{T3151} E Linhagem Granulocítica De Pacientes Portadores De Leucemia Mielóide Crônica.” Os pesquisadores responsáveis pelo estudo responderão a quaisquer perguntas que o paciente possa ter sobre este termo e sobre o estudo.

Sabe-se que a produção e amadurecimento das células sanguíneas brancas, os leucócitos, dependem de vários fatores controlados por diferentes genes e ainda possuem variados mecanismos responsáveis por atuarem na produção normal ou defeituosa dessas células. Quando em estado de desordem, estes mecanismos podem desenvolver doenças tais como as leucemias. O presente projeto pretende, portanto, estudar três genes (*SEPT5*, *TOB1* E *PAN3*) que podem estar envolvidos na proliferação das células sanguíneas brancas e estudar como eles se comportam em pacientes portadores de leucemia mielóide crônica e indivíduos controle. Para isso, serão feitas culturas de células específicas através da coleta de sangue periférico dos doadores, onde será analisada a expressão gênica destes genes durante diferentes dias da cultura de células.

Para participar, caso você queira, deverá doar 2 frascos (4 colheres de sopa cada) de sangue. Essa coleta será feita por um profissional treinado e, no máximo, poderá ficar uma pequena mancha roxa e a região poderá ficar um pouco dolorida. Além disso, serão levantados alguns dados de seu prontuário médico. O material desse estudo, caso você permita, será armazenado no Hemocentro / Unicamp e somente será utilizado para outros estudos após nova consulta ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

Você terá direito a privacidade e toda informação que for obtida em relação a este estudo permanecerá em sigilo. Os resultados deste projeto poderão ser apresentados em congresso ou em publicações, porém, sua identidade não será divulgada nessas apresentações.

A participação neste estudo é voluntária e você pode recusar-se a participar ou poderá interromper sua participação a qualquer momento sem prejuízos, inclusive retirando o material

biológico. Além disso, você terá direito a qualquer esclarecimento sobre o estudo mesmo durante o seu decorrer, basta ligar para o telefone de um dos pesquisadores.

Eu _____,
declaro ter recebido todas as informações relativas ao estudo “Análise Funcional Dos Genes *SEPT5*, *TOB1* E *PAN3* Em Cultura De Linhagens Celulares Baf3, Baf3^{GLIS} E Linhagem Granulocítica De Pacientes Portadores De Leucemia Mielóide Crônica”. Além disso eu concordo em participar do estudo e autorizo a coleta de amostras de sangue periférico que serão utilizadas nesse estudo.

Outros pontos importantes foram enfatizados:

1. Ampla liberdade de recusar-me a participar do estudo ou retirar meu consentimento ou amostra biológica em qualquer fase deste, sem penalização ou prejuízo.
2. Garantia de esclarecimentos sobre o estudo, mesmo durante o seu decorrer.
3. Garantia de sigilo que assegure a minha privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos no estudo, quando da sua divulgação ou publicação científicas.
4. Quaisquer reclamações quanto ao andamento do projeto ou dos pesquisadores, posso contatar o CEP da FCM / UNICAMP.

Portanto, concordo em participar do estudo autorizando a equipe responsável, à manipulação das amostras biológicas e dos dados e ao armazenamento do material biológico. As amostras só serão utilizadas em estudos futuros depois de submetidos ao CEP e ao CONEP.

Consentimento para participação no estudo:

Voluntário ou Responsável Legal

Pesquisador responsável

Pesquisador Orientador

Autorização para armazenamento de material biológico:

Sim Não

Consulta de questões éticas

Pesquisador: Cintia do Couto Mascarenhas

Endereço: Rua Carlos Chagas, 480

Hemocentro / FCM / Unicamp

13083-970 - Campinas - SP

Telefone: (19) 3521-8758

Pesquisador: Katia Borgia Barbosa Pagnano

Endereço: Rua Carlos Chagas, 480

Hemocentro / FCM / Unicamp

13083-970 - Campinas - SP

Telefone: (19) 3521-8759

Pesquisador: Carmino Antonio de Souza

Endereço: Rua Carlos Chagas, 480

Hemocentro / FCM / Unicamp

13083-970 - Campinas - SP

Telefone: (19) 3521-8740